



Universitat Autònoma de Barcelona

Unitat de projectes de Ciències Ambientals

***Thaumetopoea pityocampa* i nematodes
entomopatògens: un mètode alternatiu de control
biològic de la plaga.**



Autora: Laura Franquet Barrera
Director: Fernando Garcia del Pino
29 de gener de 2009

AGRAIMENTS

Agraeixo sincerament l'ajuda de Fernando Garcia del Pino, sense el qual aquest projecte no seria el que és, a E. Masip per haver-me cedit el recull de temperatures de l'any passat i d'aquest any, i finalment, a la meva família i la meva parella, per la seva col·laboració totalment desinteressada en el treball de camp. Moltes gràcies a tots.

ÍNDEX

	<u>pag.</u>
1. Introducció.....	1
1.1. Antecedents.....	1
1.1.1. La processonària del pi (<i>Thaumetopoea pityocampa</i>)	1
1.1.1.1. Biologia	1
1.1.1.2. Problemàtica	6
1.1.1.3. Mètodes de control	7
1.1.2. Els nemàtodes entomopatògens	10
1.2. Objectius.....	12
2. <u>Susceptibilitat de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> als nemàtodes entomopatògens i producció.</u>.....	13
2.1. Susceptibilitat de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> als nemàtodes entomopatògens.....	13
2.1.1. Materials i mètodes	13
2.1.2. Resultats	15
2.1.3. Discussió	17
2.2. Avaluació de les larves de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> com a hoste per als nemàtodes entomopatògens.....	19
2.2.1. Materials i mètodes	19
2.2.2. Resultats	22
2.2.3. Discussió	23
3. <u>Aplicació dels nemàtodes entomopatògens contra les larves de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> en el camp.</u>.....	25
3.1. Àrea d'estudi.....	25
3.1.1. Història i localització	25
3.1.2. Anàlisi del contingut de nemàtodes entomopatògens dels sòls de l'àrea d'estudi.	26
3.2. Avaluació del mètode d'aplicació dels nemàtodes entomopatògens en les colònies de <i>T. pityocampa</i>.....	27
3.2.1. Introducció	27
3.2.2. Materials i mètodes	28
3.2.3. Resultats	30
3.2.4. Discussió	32
3.3. Control de les larves de <i>T. pityocampa</i>: assaigs de camp.....	33
3.3.1. Introducció	33
3.3.2. Materials i mètodes	34
3.3.3. Resultats	37
3.3.4. Discussió	38
4. <u>Conclusions</u>.....	40

5. <u>Pressupost</u>	41
6. <u>Bibliografia</u>	42

1.Introducció

1.1. Antecedents

1.1.1. La processionària del pi (*Thaumetopoea pityocampa*)

1.1.1.1. Biologia

Característiques i cicle biològic¹

La processionària del pi (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.) és un lepidòpter de la família *Thaumetopoeidae*. Degut a la seva àmplia distribució i l'augment de la seva població, és una de les plagues de més importància en els boscos de la Península Ibèrica i de tota la regió mediterrània.

Els adults d'aquest insecte es caracteritzen pel seu color grisós de les ales anteriors, en les quals es destaquen les nerviacions i les vores, de color negre.. En el cas dels mascles es poden observar tres franges transversals bastant aparents, que en les femelles passen desapercebudes. En el cas de les ales posteriors presenten una coloració blanca amb una taca fosca a la regió anal. Les femelles tenen les ales posteriors igual que els mascles. (Figura 1 i 2)

Els mascles de *Thaumetopoea pityocampa* tenen el tòrax recobert de pèl grisós, i l'extrem del seu abdomen presenta abundant pilositat, a diferència del de la femella, que presenta un conjunt d'escames de color daurat.

Ambdós sexes tenen a la regió frontal del cap una protuberància còrnia, còncava, amb quatre quilles transversals.

Pel que fa a la mida d'aquest lepidòpter, les femelles són més grans que els mascles. La femella mesura de 36 a 49 mm de llargada, i els mascles mesuren entre 31 a 39 mm.



Figures 1 i 2: D'esquerra a dreta, mascle i femella d'adults de *Thaumetopoea pityocampa*.

Font: Butlletí "Plagues i malures dels nostres arbres" del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya

¹ Informació extreta de Bachiller *et al*, 1981.

Els adults emergeixen del sòl als vespres dels dies d'estiu. Les últimes papallones emergeixen al voltant de setembre. La copula té lloc normalment el mateix dia de l'emergència. Un cop finalitzada, la femella emprèn el vol per escollir el lloc de la posta. Les papallones són capaces de distingir les siluetes de pins que destaquen en l'horitzó, i sembla que mitjançant l'olfacte també poden diferenciar les diferents espècies de pi per escollir preferentment la que els agrada més. La posta tindrà lloc quan la papallona hagi trobat un parell d'acícules del gruix necessari perquè pugui suportar el pes dels ous, tot i que si no el troben i passa el temps, la fan en el lloc que troben més adequat.

La posta, un cop acabada, presenta l'aspecte d'un cilindre de color palla, ja que els ous queden recoberts de les escames que la femella té a l'extrem de l'abdomen.

Les erugues naixen al cap de 30 a 50 dies. Aquestes tindran un comportament gregari tota la seva vida. Un cop han nascut comencen a alimentar-se de les fulles del voltant de la posta. (Figura 3)

En el primer estadi es desplacen poc, i fan nius a cada conjunt d'acícules on es detenen, tot i que aquests tenen molt poca consistència. Només es mengen les parts tendres de les fulles, de manera que produeixen un dany molt característic: en els pins afectats es veuen poms d'acícules semisecs i d'un color esblanqueït, i a la base d'aquests s'observa un entreteixit de fils de seda amb els excrements de les erugues. (Figura 4) Aquest estadi sol durar entre 8 i 12 dies, depenent de la localitat.



Figura 3: Aspecte que presenten les erugues en el seu primer estadi. En segon pla, posta d'on han nascut les erugues.



Figura 4: Efectes dels estadis inicials de *Thaumetopoea pityocampa*.

En el segon estadi segueixen tenint les mateixes pautes de comportament. Hi ha petites diferències pel que fa a la llargada i quantitat dels desplaçaments, que es fan menys freqüentment i a més distància, i pel que fa als danys que produeixen, que són una mica més evidents. Aquesta fase dura entre 12 i 18 dies.

Un cop feta la segona muda, a les erugues els apareixen els pèls urticants. És en aquest tercer estadi en el que es sol produir l'emplaçament definitiu de la colònia,

moment en el que es formen les clàssiques bosses que es poden observar els mesos d'hivern en els pins. Aquesta fase sol durar aproximadament un mes.

El quart estadi és el que té una duració més variable: en les zones càlides és típic que les erugues superin aquest estadi en un mes, en canvi, en les zones fredes, les erugues passen tot l'hivern en aquest estadi. En el Serrall del Grau, situat al nord de La Bisbal de Falset, s'ha observat que la majoria de les erugues han passat aproximadament un mes en aquest estadi, encara que s'ha observat desigualtats entre alguns grups, de manera que algunes han realitzat la quarta muda més tard. Durant aquest estadi, les erugues surten cada nit del niu per alimentar-se, i teixeixen sobre el niu, de manera que agafa cos i s'acaba convertint en una bossa blanca i compacta.

És ja en el cinquè i últim estadi en el qual es produeixen els danys més severos en els pins (Figura 5). En aquesta fase les erugues s'alimenten de forma molt activa i es mengen per complet les acícules del pi en el que han emplaçat el niu. Si es dona el cas de que es quedin sense aliment, formen processons per baixar a terra i canviar de pi per buscar més aliment. En el moment que arriben a la maduresa, es preparen per baixar del niu i enterrar-se en el sòl per crisalidar.



Figura 5: Aspecte que presenta un exemplar de *Pinus halepensis* després d'un atac sever de *Thaumetopoea pityocampa*. En aquest cas les erugues han abandonat el pi per continuar-se alimentant.

Les processons tenen lloc després de la sortida del sòl. L'eruga capdavantera és femella, ja que sembla ser que estan més ben capacitades per escollir el lloc idoni per l'enterrament. Normalment té lloc a les vores dels boscos o en clars del mateix, per tal de que quan estiguin enterrades els arribi l'escalfor del sol. En localitats càlides, canvien l'emplaçament i s'enterren en zones amb ombra. La profunditat a la que s'enterren dependrà de l'estructura del sòl.



Figura 6: Processó d'erugues de *Thaumetopoea pityocampa* dirigint-se a un lloc adequat per a l'enterrament.

Font: Butlletí "Plagues i malures dels nostres arbres" del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya



Figura 7: Pupa d'una larva de *Thaumetopoea pityocampa*.

Un cop enterrades, fabriquen un capoll i entren en fase de prepupa, en la que només es donen canvis interns, i finalment muden per convertir-se en crisàlide (Figura 7). Aquesta última es desenvolupa en tres fases, de les quals destaca la segona, en que s'atura el desenvolupament de la crisàlide. Aquesta aturada, anomenada diapausa, pot durar des d'un mes fins 2 o 3 anys en localitats fredes. La seva llargada varia en funció de la temperatura, la qual cosa assegura que el naixement de les papallones es donarà quan hi hagin les condicions adequades per a la seva reproducció. Un cop passat el temps que necessita la crisàlide per transformar-se en adult, aquests s'alliberen del seu embolcall i remouent el sòl surten a l'exterior.

Influència de la temperatura en el comportament de les erugues.

Existeixen diferents nivells de temperatura que tenen influència sobre les erugues de processionària:

- Llindars letals superior i inferior: la temperatura a l'interior del niu no pot superar els 32°C. Quan la temperatura arriba als 30°C, les erugues

abandonen el niu i la colònia es dispersa. En el cas de que s'arribi als 32°C les erugues moren. Per una altra banda, una eruga sola és capaç de resistir fins a -7°C. En el cas de que les temperatures baixin fins a -12°C pot arribar a morir fins i tot la colònia sencera.

- Llindar d'activitat: les erugues detenen la seva activitat quan la temperatura baixa per sota dels 10°C.
- Llindar de desenvolupament: la temperatura idònia per al desenvolupament de la colònia està entre 20°C i 25°C. Entre 10 i 20°C les erugues surten també a alimentar-se, però no es desenvolupen.

Aquests diferents llindars influeixen en la ubicació de la bossa definitiva, ja que les erugues necessiten l'escalfor del sol per mantenir la temperatura per al seu correcte desenvolupament. És per aquest motiu que el més freqüent és trobar les bosses a les parts altes de les capçades dels pins en zones fredes.

Distribució europea i espanyola

La processonària del pi, degut als llindars de temperatura que acoten la seva distribució, es troba bàsicament en l'àrea mediterrània. Podem trobar-la a Espanya, Portugal, Itàlia, alguns indrets d'Alemanya, Suïssa, Hongria i Bulgària, a les costes de l'Adriàtic, Grècia, Turquia, Síria, Líban, Palestina, Israel, Egipte, Líbia, Tunis, Algèria i Marroc. Sol afectar, de forma preferent, les pinedes on hi hagi *Pinus nigra*, *Pinus canariensis* i *Pinus sylvestris*. En el cas de que no hi hagin aquestes espècies, la processonària també pot atacar de forma important a *Pinus pinaster*, *Pinus halepensis* i *Pinus pinea*.

A la Península Ibèrica viu a tot el territori incloent les Illes Balears, tot i que hi ha zones on s'hi troba menys abundància de l'espècie. Això és degut a que en les muntanyes on es superin cada hivern les temperatures negatives de -10°C i -12°C no hi podrà viure. Però en general, hi ha pocs indrets en el nostre territori on la temperatura suposi una barrera per al desenvolupament de l'espècie.

Cal tenir en compte també que les variacions del clima anuals poden afavorir o dificultar el desenvolupament d'aquesta espècie. Els hiverns càlids afavoreixen el seu creixement i expansió. La temperatura mitjana anual a Espanya ha augmentat entre 0,8 i 1,1°C en el període de 1901-2005 (Jarauta *et al.*, 2006), la qual cosa ens mostra que hi ha un lent però constant escalfament global. Això fa que lentament es vagin canviant les distribucions d'aquesta espècie. Com a exemple, podem veure que aquest any s'han observat danys severs en els boscos de pi en alçades de 1600 m a 2400 m a Sierra Nevada, la qual cosa està provocant grans conseqüències a causa de la poca viabilitat del *Pinus sylvestris* en la zona, ja que la quantitat de llavors del mateix que aconsegueixen germinar és molt poca. Aquest indret no havia estat afectat mai de forma greu per la plaga, i cal posar mitjans per evitar la desaparició de l'espècie en l'indret. L'escalfament global també fa que els períodes de diàpauza s'escurcin, i si abans podien tardar dos anys en emergir els adults del seu capoll, passen a fer-ho d'any en any, incrementant la població de l'espècie.

També afecten la distribució de l'espècie els fenòmens meteorològics, el grau de maduresa dels ecosistemes, l'agressivitat genètica de la població i la resistència

fisiològica de les espècies de coníferes de les que s'alimenten les erugues (Rejat, 1998).

1.1.1.2. Problemàtica

La processionària del pi és el insecte que perjudica més els boscos de pi de la Península Ibèrica. Això és degut a la seva alimentació, ja que les erugues no es limiten a alimentar-se del pi en el que estableixen la seva colònia, sinó que també poden defoliar pins pròxims en migrar buscant aliment (Bachiller *et al*, 1981). Si la defoliació no es dona en grau molt extrem, el pi afectat tornarà a recompondre tot el sistema foliar que havia estat perjudicat.

La incidència de la plaga sobre les diferents espècies de pins dependrà del temps que triguin en canviar les seves fulles: els exemplars de *Pinus pinaster* notaran més els efectes de la processionària ja que canvien les acícules en cicles de 4 anys, i en canvi, els efectes sobre *Pinus halepensis* es notaran molt menys temps ja que les seves acícules solen durar entre 1 i 2 anys.

Els problemes més greus es donen quan després d'un atac de processionària es dona un atac de perforadors de gemmes (*Rhyacionia buoliana* Lepidoptera: Tortricidae)). Aquests es distribueixen a la meitat nord de la península ibèrica, a diferència de *Rhyacionia duplana*, que té una distribució més meridional, i afecta de forma més greu els boscos del centre i sud de la Península (Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente). Si es dona aquesta situació, els exemplars afectats poden arribar a morir.

En el cas de repoblacions forestals les primeres infestacions de la plaga no solen ser greus: les primeres bosses apareixeran de forma dispersa i escassa, quan els arbres arriben aproximadament al metre d'alçada, sempre amb algunes excepcions. L'any següent ja es trobaran bosses de manera més uniforme aproximadament en un 4% dels peus, però al cap de 2 anys ja poden resultar afectats un 70% dels peus, arribant al cap de 3 anys a afectar tots els peus de la repoblació.

Quan la plaga arriba al seu punt àlgid, poden arribar a veure's afectades centenars d'hectàrees, sobretot si la massa forestal està composta per les espècies per les que mostren preferència. Aquest fet pot representar un problema si es tracta d'un bosc format essencialment per una espècie endèmica.

Un dels altres problemes greus que provoca la processionària és l'aparició de reaccions al·lèrgiques en les persones per exposició a les espícules de les erugues. Presenten dos mecanismes d'acció (Artola-Bordàs *et al.*, 2008): un d'immediat toxic-irritatiu al clavar-se els pèls i espícules a la pell i injectar un verí amb alliberament d'histamina, i un altre al·lèrgic, mitjançant un mecanisme IgE., que es dona quan hi ha hagut exposicions repetides. El mecanisme IgE es basa en la immunoglobulina E, que és un tipus d'anticòs present únicament en mamífers que està implicat en l'al·lèrgia i la resposta immunològica a diferents agents patògens. En general, el primer ocasiona quadres de dermatitis i el segon provoca urticàries generalitzades, dispnea aguda, conjuntivitis, asma, rinitis i angioedema. Aquestes reaccions

al·lèrgiques fan que la seva presència en àrees d'esbarjo i en llocs públics causi greus problemes.

L'existència de la plaga també afecta a les activitats econòmiques relacionades amb la silvicultura. La recollida de pinyes de *Pinus pinea* en alguns llocs no es pot realitzar a causa de les reaccions al·lèrgiques que provoca la sobreexposició. També en les àrees de treballs silvícoles es veu afectada l'activitat en els mesos en que les erugues ja han arribat als últims estadis.

El fet de que cada cop les temperatures siguin més altes fa que cada cop es desplaci l'espècie cap a indrets més elevats, tal com ja s'ha comentat anteriorment. Això provoca un desplaçament del seu nínxol ecològic. El seu establiment en llocs on no és habitual fa que no hi hagi cap depredador que controli la plaga, de manera que la seva població creix exponencialment trencant l'equilibri present en l'ecosistema.

1.1.1.3. Mètodes de control

La problemàtica que porta associat el creixement de la població de *Thaumetopoea pityocampa* fa que s'hagin hagut de buscar diferents mètodes per controlar la plaga. Actualment podem dividir-los en quatre grans blocs: els mètodes mecànics, els mètodes químics, els mètodes biorracionals i els mètodes biològics.

Mètodes mecànics

Actualment trobem dos mètodes que encaixen en aquest bloc. Serien la poda de les bosses amb la conseqüent destrucció de les mateixes cremant-les o aplastant-les contra una superfície dura si són petites, i la destrucció de la bossa a trets.

La poda de les bosses es duu a terme normalment amb unes tisores col·locades en un allargador de 3 o 4 metres de longitud. En el cas de que la bossa estigui a la guia terminal de l'arbre, no es podrà podar i s'haurà d'utilitzar un altre tipus de tractament. Aquest sistema no és molt perjudicial per al medi, però és molt costós tant en dificultat com en temps, la qual cosa fa que no s'utilitzi molt.

La destrucció de la bossa a trets és una altra tècnica que generalment es dur a terme en el cas de que l'alçada dels arbres sigui massa gran com per poder utilitzar mètodes menys agressius. Es solen utilitzar bales de perdigons. El problema d'aquest mètode rau en la dispersió dels perdigons que no impacten sobre el niu i en l'encariment de la munició utilitzada. Els perdigons solen ser de plom, la qual cosa provoca una certa contaminació per metalls pesants al voltant de la zona on es faci l'aplicació.

Mètodes químics

Són els que es basen en productes químics per controlar la població de la plaga. Aquests últims són piretroids, i es diferencien en la seva aplicació: alguns s'apliquen amb polvoritzadors, i alguns de forma més localitzada, amb l'ajut de balins.

Sanchis *et al.* (1990) descriuen els piretroids destacant que tenen una gran acció de xoc però escassa persistència, de manera que amb la seva aparició varen revitalitzar els tractament bossa a bossa substituint les aplicacions massives i la destrucció dels nius a trets d'escopeta de caça, reduint l'impacte sobre el medi que aquestes suposaven. Els millors resultats amb els piretroids s'obtenen quan es barregen amb aigua polvoritzant lleugerament la bossa (Bachiller *et al.*, 1981), i tenen una efectivitat del 100%. Alguns dels que estan registrats i que s'utilitzen actualment són el Alfa-cipermetrin, el cipermetrin, el deltametrin, el bifentrin, el betaciflutrin, etc.

L'inconvenient més important que presenten aquest tipus d'insecticides és que estan catalogats amb la categoria toxicològica II o III, depenent del principi actiu del producte, per les persones, A (innocu) per mamífers i aus i C (molt perillós) per als peixos i les abelles. En conjunt es determina que són nocius per les persones i perillosos per a medi ambient.

Una variant del sistema de la destrucció dels nius amb escopeta és d'utilització de balins amb el piretorid deltametrin. Aquest s'introdueix als nius amb carrabines d'aire comprimit. Els balins portadors del producte s'elaboren a base de balins amb cua de forma troncocònica, agregant sobre el cap dels mateixos l'insecticida en forma de concentrat emulsionable al 2,5% en càpsules de gelatina de 3 g/mm². La seva aplicació resulta una tècnica eficaç per la senzillesa de la seva aplicació en arbres aïllats i de zones difícilment accessibles (Rejat, 1998).

L'inconvenient principal del deltametrin rau en que el contingut en insecticida dels balins podria quedar escampat pel sòl en cas de que aquest no arribés al seu objectiu, tot i que aquest sistema implica menys danys sobre el medi que la utilització d'insecticides amb polvoritzadors., ja que les dosis utilitzades són molt més petites.

Mètodes biorracionals

Podem trobar dos grups d'insecticides que s'utilitzen actualment contra processionària amb aquesta metodologia: els reguladors del creixement i la utilització de feromones.

Els reguladors de creixement es poden aplicar en qualsevol estadi però és recomanable fer-ho quan les erugues estan en el seus primers estadis. El seu principi actiu inhibeix la producció de quitina, impedit que puguin mudar, i moren en intentar-ho. No és un mètode immediat, s'observaran resultats quan arribi el moment de la muda. Si es fa en els primers estadis, donada la curta durada dels mateixos, els resultats seran evidents al cap de molt poc temps. En canvi, si la seva aplicació es fa en erugues de 4t estadi, els resultats poden tardar molt de temps en fer-se visibles. La seva aplicació es sol fer amb l'ajut d'avionetes, ruixant l'àrea afectada. El primer en provar-se va ser el diflubenzuron, però amb el pas del temps se'n han sintetitzat d'altres com el triflumuron. Actualment només estan permesos el diflubenzuron i el flufenoxuron.

Els inconvenients que presenten els inhibidors de síntesi de quitina són la seva alta persistència en el medi. El fet de que els insecticides siguin selectius pot fer que morin altres espècies d'artròpodes de l'ecosistema. També és un problema la

utilització en quasi tots els casos de gasoil com a vehicle de producte insecticida, (Sanchis *et al.*, 1990)

La utilització de feromones es basa en la col·locació de trampes carregades amb la feromona sexual que segrega la femella sintetitzada artificialment, anomenada "pityolure". Podem trobar trampes seques, en les quals el mascle entra i no en pot sortir, i les trampes amb un recipient que utilitzen una mena de cola perquè hi quedin atrapats (Nuñez i Ramonell, 2002). És un mètode que no s'utilitza per controlar la població. La seva funció és fer una estimació i seguiment de la població i determinar el moment adequat per fer les aplicacions de control amb altres productes.

Mètodes biològics

En vista de les complicacions que sorgeixen amb els mètodes químics s'han dirigit les investigacions cap a la recerca de mètodes biològics de control de *Thaumetopoea pityocampa*. S'ha trobat diferents maneres de fer front a la plaga: l'aplicació de *Bacillus tuningensis* com a insecticida microbiològic i la utilització d'enemics naturals.

L'aplicació de *Bacillus tuningensis* s'utilitza molt de forma massiva. Cal tenir en compte que la seva eficàcia és bona durant els tres primers estadis (Bachiller *et al.*, 1981), ja que quan l'eruga passa al quart estadi adquireix resistència al mateix i és més difícil que provoqui la mortalitat de l'individu. Tot i això, cal dir que amb aquest sistema s'ha demostrat que els resultats obtinguts són bastant més bons que els d'alguns tractaments químics.

La processonària del pi té molts enemics naturals. A la taula 1 es mostren per grups i es destaquen les característiques més importants a tenir en compte a l'hora d'escollir-los per a combatre la plaga. A l'hora d'utilitzar-los com a mètode per reduir les poblacions de la processonària cal potenciar la presència de l'espècie escollida a l'àrea afectada. En el cas dels ocells, els que es fa és construir caixes niu i repartir-les per la zona, per facilitar la nidificació de les diferents espècies.

Taula 1: Enemics naturals de *Thaumetopoea pityocampa*.

Font: extreta de <http://www.infoagro.com/forestales/procesionaria2.htm>

PARÁSITOS		DEPREDADORES	
Parásitos de huevos	Observaciones	Aves	Observaciones
<i>Tetrastichus servadei</i> Dom. (Hym. Eulophidae)	Abundante y frecuente. Índice de parasitismo por encima del 50 %	Carboneros	Orugas. Los más eficaces.
<i>Oencyrtus pityocampae</i> Mercet. (Hym. Oencyrtidae)	Abundante y frecuente. Índice de parasitismo por encima del 50 %	Herrerillos	
<i>Trichogramma evanescens</i> Wes. (Hym. Trichogrammatidae)	Frecuente. Escasa eficacia.	Abubillas	Orugas.
<i>Anastatus bifasciatus</i> B. de Fonsc. (Hym. Eupelmidae)	Poco frecuente.	Críalos	Orugas.
Parásitos de orugas o crisálidas	Observaciones	Urracas	Orugas.
<i>Phryxe caudata</i> Rond. (Dipt. Tachinidae)	Parásito específico. Durante diapausa. Alta eficacia.	Cuervos	Orugas.

<i>Compsilura concinnata</i> Meig. (Dipt. Tachinidae)	Frecuente. No específico.	Mamíferos	Observaciones
<i>Exorista larvarum</i> Rond. (Dipt. Tachinidae)	Menos frecuente. No específico.	Lirón careto	Puede extraer a las orugas y crisálidas de su lugar de enterramiento.
<i>Erigorgus femorator</i> Aub. (Hym. Ichneumonidae)	Específico de orugas (4º y 5º estadio). Hasta un 20 % de parasitismo en un mismo nido.	Murciélagos	Buen control sobre adultos.
<i>Villa brunnea</i> Beck. (Dipt. Bombyliidae)	Específico. Ataca a crisálidas. Buen control.	Insectos	Observaciones
<i>Meteorus versicolor</i> Wesm. (Hym. Braconidae)	No específico. Orugas hasta 4º estadio.	Hormigas, cigarras y avispas	Atacan a diversos estados de desarrollo
<i>Apanteles</i> sp. (Hym. Braconidae)	Muy frecuente en la Baleares	<i>Xanthandrus comtus</i> Harr. (Dipt. Syrphidae)	Orugas en sus primeros estadios.
<i>Psychophagus omnivorus</i> Walk. (Hym. Pteromalidae)	No muy frecuente. Ataca a crisálidas. Muy eficaz.	ENFERMEDADES	
<i>Conomorium eremita</i> Foerts. (Hym. Pteromalidae)	No muy frecuente. Ataca a crisálidas. Muy eficaz.	Virus de la poliedrosis	Pueden ocasionar importantes bajas
<i>Ichneumon rudis</i> Fonsc. (Hym. Ichneumonidae)	Poco abundante y poco frecuente. Crisálidas.	Enfermedades bacterianas	

1.1.2. Els nematodes entomopatògens²

Els nematodes entomopatògens són paràsits obligats d'insectes, i presenten una relació simbiòtica amb una bactèria que els dóna una enorme potencialitat com a bioinsecticides. Aquests nematodes pertanyen a dues famílies de l'ordre Rhabditida: la família Steinernematidae i la Heterorhabditidae. El cicle de vida de tots dos és molt similar (Figura 8)

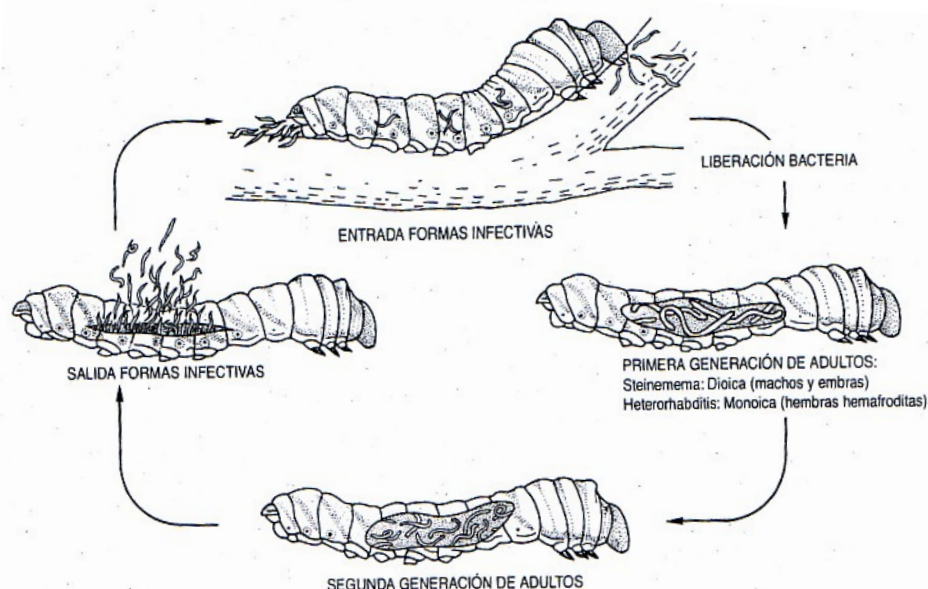


Figura 8: Cicle de vida dels nematodes entomopatògens.

Font: Garcia del Pino, 2005.

² Informació extreta de Garcia del Pino, 2005

Aquests nematodes només poden viure fora del insecte en forma infectiva. Aquesta correspon a un tercer estadi juvenil infectiu. En aquest estadi, els nematodes no s'alimenten, tenen tant la boca com el anus tancats. Són precisament aquestes formes infectives les que s'encarreguen de buscar el insecte, i ho fan detectant els productes d'excreció dels mateixos, de manera que els utilitzen com a rastre. Cal dir també que transporten en l'intestí unes 200 cèl·lules d'una bactèria simbiònt del gènere *Xenorhabdus* o *Photorhabdus*.

Un cop el localitzen, l'entrada té lloc per les obertures naturals del mateix, és a dir, la boca, l'anus o els espiracles, i quan es troba dins el sistema digestiu o traqueal del insecte, entra a l'hemocel i allibera les bactèries simbiònts que transporta en el seu interior. Aquestes últimes es multipliquen ràpidament en la hemolimfa, i maten el insecte per septicèmia, aproximadament de 24 a 48 hores després.

Quan el insecte mor és el moment en el que el nematode comença a alimentar-se de la bactèria, i va mudant fins arribar al quart estadi, arribant a l'estadi d'adults, mascles i femelles de primera generació. Aquests es reproduïxen donant una segona generació, i així successivament fins que s'esgota l'aliment del cadàver del insecte. Quan això passa, el segon estadi del nematode emmagatzema les bactèries en una vesícula del tub digestiu, muda i es converteix en forma infectiva. Aquestes sortiran del cadàver del insecte, passant al medi per localitzar un nou insecte per parasitar-lo.

Els nematodes de la família *Heterorabditidae* es diferencien dels steinernemadis en que la primera generació d'adults és monoica, composta únicament per femelles hermafrodites. El bacteri que transporten pertany al gènere *Photorhabdus*, el qual presenta luminescència.

Hi ha diferents característiques dels nematodes que poden limitar la seva eficàcia. Per exemple, el fet de que els nematodes entrin normalment per obertures naturals pot suposar un obstacle per als mateixos, ja que es poden donar casos en que el insecte defeqüi freqüentment, que tingui unes mandíbules fortes que els provoqui danys i que es netegi, de manera que el nombre de nematodes que entrarà al insecte es veurà disminuït.

Per una altra banda, les interaccions amb el sistema immunitari del insecte també poden afectar la seva eficàcia, ja que aquest identifica els nematodes com a cossos estranys i els encapsula. Aquest comportament s'ha observat en ortòpters, coleòpters, dípters i lepidòpters. Tot i que aquesta capacitat és limitada, comporta que alguns dels nematodes quedin inactivats abans de l'alliberament del bacteri.

El comportament de recerca dels nematodes també pot afectar la seva eficàcia a l'hora de parasitar, ja que aquest variarà depenent de l'espècie. Algunes espècies com és *S. carpocapsae* presenten un comportament "d'emboscada": romanen quietes quan s'apliquen i es comencen a moure en passar un insecte. Pel que fa als desplaçaments en el sòl, es troba normalment en les capes superficials, i si es mou tendeix a fer-ho cap amunt. Per una altra banda, podem trobar també nematodes "navegants", que des del primer moment es desplacen buscant un possible hoste. Aquest és el cas de *H. bacteriophora*. Aquest es troba normalment en capes més profundes del sòl (8 - 35 cm), i quan es mou tendeix a fer-ho cap avall, però també es mou per tota la columna de sòl.

Finalment, la supervivència en el medi és un factor important a considerar. Aquesta variarà en funció de l'espècie, el seu comportament, la seva taxa metabòlica i la quantitat de reserves de nutrients de les que disposi, així com altres factors biòtics i abiòtics. Altres factors com la temperatura, la humitat i la concentració de sals o plaguicides també poden tenir una influència sobre els nematodes: toleren molt bé les temperatures baixes, de fet, es conserven en fred, però les temperatures altes (32°C) poden provocar efectes adversos sobre la seva reproducció. Cal dir també que els nematodes són molt sensibles a la dessecació, ja que necessiten una pel·lícula d'aigua al seu voltant per poder moure's.

Els nematodes entomopatògens són especialment interessants per combatre plagues d'insectes per diferents motius: es tracta d'un sistema molt segur, ja que els nematodes són letals per molts insectes, però molt segurs per a l'home, les plantes i altres animals, ja que no contaminen el medi ambient. No cal utilitzar equips de protecció personal, no calen períodes de seguretat i no deixen residus ni contaminen les aigües subterrànies. També destaquen per la seva fàcil aplicació amb els aparells convencionals. Triguen unes 24 - 48 hores en matar al insecte, i són capaços de trobar-lo activament en hàbitats ocults, com poden ser sòls i galeries. Cal destacar que tenen un avantatge molt gran respecte a la resta de mètodes de lluita ja que amb la reproducció del nematode en l'interior del insecte pot haver-hi un efecte multiplicador de la dosi inicial aplicada .

1.2. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta investigació és determinar la viabilitat dels nematodes entomopatògens per controlar les plagues de *Thaumetopoea pityocampa*, tenint en compte que presenten tot un seguit de característiques que els fan adequats per al control de diferents plagues d'insectes. Per assolir aquest objectiu principal s'han plantejat un seguit d'objectius secundaris:

- Avaluar la susceptibilitat de la processionària als nematodes entomopatògens.
- Determinar la producció de nematodes entomopatògens en larves de *T. pityocampa* i comparar-ho amb la producció en larves de *G. mellonella* per determinar la idoneïtat de les larves de processionària com a hostes per als nematodes entomopatògens.
- Avaluar el mètode d'aplicació i la dosi necessària de nematodes entomopatògens en proves de camp.
- Avaluar la efectivitat de l'aplicació dels nematodes entomopatògens sobre colònies de processionària del pi al camp.

2. Susceptibilitat de les larves de *Thaumetopoea pityocampa* als nematodes entomopatògens i producció.

2.1. Susceptibilitat de les larves de *Thaumetopoea pityocampa* als nematodes entomopatògens.

La finalitat del present estudi va ser determinar a quina de les tres espècies de nematode entomopatògen proposades és més sensible *T. pityocampa*, per avaluar quina de les tres seria la millor per a dur a terme els assajos en camp.

Cal dir que actualment no existeixen publicacions sobre avaluació de la susceptibilitat de les larves de *T. pityocampa* enfront els nematodes entomopatògens, ni en condicions de laboratori ni en condicions de camp. Es poden trobar publicacions sobre mortalitat de *T. pityocampa* per nematode entomopatògens: Triggiani i Tarasco (2001) van avaluar la viabilitat per a controlar la plaga de processionària amb *S. feltiae*, utilitzant soques recollides en camps de *P. halepensis* de diferents regions d'Itàlia. Cal tenir en compte que en aquest cas la susceptibilitat a l'espècie es va avaluar amb *G. mellonella* a una temperatura de 10°C. No hi ha constància d'avaluacions de susceptibilitat en condicions de laboratori amb *T. pityocampa*. Pel que fa a *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* tampoc hi ha un recull de dades de susceptibilitat en *T. pityocampa*. En Triggiani i Tarasco (2002) es fa una comparació la comparació de la mortalitat entre les tres espècies en camp, però no es comprova la susceptibilitat.

2.1.1. Materials i mètodes

Tipus de nematodes

Les espècies de nematode escollides per dur a terme aquest assaig varen ser *Steinernema carpocapsae* (soca B14), *Steinernema feltiae* (soca PA) i *Heterorhabditis bacteriophora* (soca DG46). S'han escollit aquestes espècies perquè són algunes de les que s'han aïllat a Espanya i pel fet de que són algunes amb les que es treballa més freqüentment, i per tant, estan molt ben caracteritzades. Els nematodes utilitzats van ser criats en larves de últim estadi de l'arna de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleridae) a 25°C, d'acord amb els procediments descrits per Woodring & Kaya (1998). Les formes infectives que es van obtenir es van emmagatzemar a 7°C de 7 a 14 dies abans de ser utilitzats. Abans de la seva aplicació es van deixar aclimatar a temperatura ambient (21-23°C).

Larves de processionària

Les larves de processionària que es van utilitzar en aquest assaig es van obtenir d'un bosc de rebrotada al nord de La Bisbal de Falset (Priorat). L'extracció de larves dels nius es va efectuar després de refrigerar-los durant 24 hores per alentir el metabolisme de les larves, i d'aquesta manera evitar que amb el moviment

s'alliberessin espícules que poguessin provocar reaccions al·lèrgiques. Cal tenir en compte que només es van seleccionar les larves que haguessin arribat al 4t o 5è estadi. Posteriorment es van anar pesant una a una i col·locant-les en les plaques de petri de l'assaig de laboratori

Assaig de laboratori

L'assaig es va preparar en plaques de Petri de 5 cm de diàmetre amb sorra estèril fins aproximadament la meitat, de manera que conjuntament pesessin aproximadament 16 g. Tenint en compte que la humitat de la sorra estèril era d'un 1% d'aigua, es va afegir aigua de l'aixeta estèril fins obtenir un 12% d'aigua (p/p), humitat necessària per a que els nematodes puguin sobreviure i mantenir la seva activitat.

La dosi de nematodes utilitzada era una mica menor a la quarta part de la dosi comercial, que és de 500.000 nematodes/m², de manera que tenint en compte la superfície de les plaques conjuntament amb la sorra estèril es va calcular que la dosi a introduir era de 236 nematodes per placa, equivalent a 12 nematodes/cm². A cada placa de petri s'hi va introduir una larva i es van realitzar tres sèries de 10 larves cadascuna de manera que es van utilitzar 30 erugues per soca de nematode i 3 sèries més per al control. Un cop va estar tot preparat es varen inocular els nematodes entomopatògens a totes les plaques, i es varen col·locar en caps amb tapa per conservar la humitat. Finalment, es van dipositar en una incubadora a 23°C fins que l'assaig va finalitzar. Tot l'experiment es va repetir dos vegades.



Figura 9: Larva de *Thaumetopoea pityocampa* infectada per *Heterorhabditis bacteriophora* en l'assaig de susceptibilitat.



Figura 10: Cadàver de larva de *T. pityocampa* infectat per *S. carpocapsae* en l'assaig de susceptibilitat. Es pot observar la sortida de formes infectives per la boca i l'anus.

Per avaluar l'efectivitat dels nematodes es van efectuar dos controls de mortalitat, un als 4 i l'altre als 10 dies de la infecció (Figures 9 i 10). Un cop passat aquest temps, es van dissecar totes les larves mortes per corroborar que haguessin estat infectades per nematodes. La funció d'aquesta dissecció va ser eliminar possibles factors confusors, ja que hi ha fongs entomopatògens que també parasiten les larves d'insectes i que en provoquen la mort, i per tant, poden crear biaixos en els resultats.

Per comprovar la viabilitat dels nematodes, en les plaques on no es va observar mortalitat, als 10 dies es va afegir una larva de *Galleria mellonella*, descartant així que les larves continuessin vives a causa de la mort dels nematodes.

Anàlisi estadístic

Previ al tractament de les dades es va realitzar una transformació de les mateixes pel arccosinus de l'arrel del percentatge de mortalitat, i es va avaluar si aquestes seguien una distribució normal. Donat que el resultat va ser afirmatiu, les dades es van avaluar mitjançant una Anova d'un factor (ONEWAY, SPSS - PC) per veure si hi havia diferències significatives de mortalitat per les diferents espècies de nematode, incloent també la prova de Tukey per avaluar aquestes diferències per parelles. Per avaluar si hi havia diferències significatives entre la mortalitat en el 4t dia i en el 10è dia per cada espècie de nematode, s'ha aplicat una T-Test (T-TEST, SPSS - PC) per a mostres independents. S'ha utilitzat un nivell de significació de $P \leq 0,05$ en tots els anàlisis estadístics.

2.1.2. Resultats

El tractament de les dades recollides ens mostra que hi ha diferents percentatges de mortalitat en les diferents espècies i entre els diferents dies (figura 11).

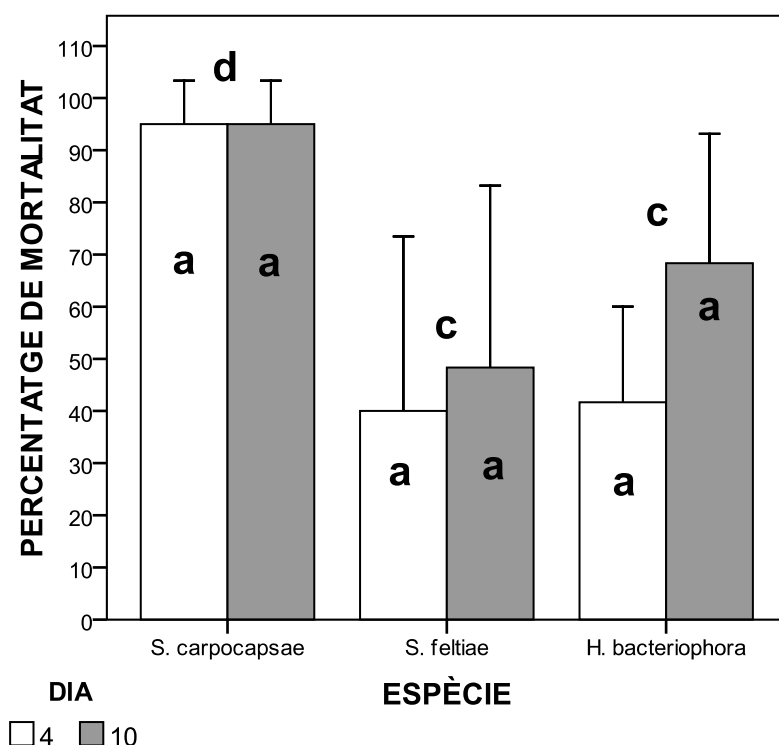


Figura 11: Percentatge de mortalitat per espècie i dia (les barres mostren les mitjanes de mortalitat i les barres d'error, la desviació típica; les barres que tenen la mateixa lletra no són significativament diferents, i els grups que tenen la mateixa lletra tampoc; $P \leq 0,05$, Tukey test).

Si s'observen els resultats obtinguts al cap de 4 dies de la infecció, es pot veure que en general hi ha diferències significatives entre la mortalitat produïda per les diferents espècies (Anova: $F=11,085$, $P=0,001$). La mortalitat produïda per *S. carpocapsae* és significativament més gran a la produïda per *S. feltiae* (Tukey test: $P=0,003$) i també a la produïda per *H. bacteriophora* (Tukey test: $P=0,002$), però la mortalitat produïda per *S. feltiae* no és significativament diferent a la de *H. bacteriophora* (Tukey test, $P=0,997$).

Per una altra banda, observant els resultats al cap de 10 dies de la infecció es pot observar en general que també hi ha diferències significatives entre la mortalitat entre espècies (Anova: $F=5,042$, $P=0,021$). En aquest cas la mortalitat produïda per *S. carpocapsae* continua sent significativament major a la de *S. feltiae* (Tukey test: $P=0,018$), però no a la de *H. bacteriophora* (Tukey test: $P=0,139$). En el cas de *S. feltiae* i *H. bacteriophora*, la mortalitat comparada entre tots dos continua sent significativament diferent (Tukey test: $P=0,530$).

Si s'avalua cada espècie per separat es pot determinar si les diferències de mortalitat entre dies són significativament diferents.

En el cas de *S. carpocapsae* no hi ha diferències significatives de mortalitat entre dies (T-Test: $F=0,000$, $P=1$).

Si es valora la diferència de mortalitat per *S. feltiae* podem veure que tampoc hi ha diferències significatives (T-Test: $F=0,068$, $P=0,717$). El percentatge de mortalitat varia molt poc del dia 4 al dia 10.

En el cas de *H. bacteriophora* no s'observen diferències de mortalitat estadísticament significatives entre dia 4 i dia 10 (T-Test: $F=2,851$, $P=0,064$), però presenta una mortalitat considerablement més gran el dia 10 (68,33%) que el dia 4 (41,67%)

2.1.3. Discussió

Els anàlisis estadístics que avaluen les diferències de mortalitat produïda per les diferents espècies mostren que *S. carpocapsae* produeix significativament més mortalitat que la resta al cap de 4 dies de la infecció. La mortalitat produïda per *S. feltiae* i *H. bacteriophora* és molt similar però difereix molt de la de *S. carpocapsae*.

Pel que fa a les diferències entre espècies al 10è dia de l'aplicació es pot veure que *H. bacteriophora* ha experimentat una recuperació i s'ha produït un augment de mortalitat, la qual cosa ha fet que les diferències entre *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* ja no siguin significatives. Aquest fet té a veure amb el comportament de l'espècie, ja que el gènere *Heterorhabditis* tarda més en matar el insecte que el gènere *Steinernema*. Pel que fa a *S. feltiae*, no experimenta canvis significatius.

Així doncs, *S. carpocapsae* seria clarament una bona opció per a controlar les larves de *Thaumetopoea pityocampa* ja que són molt susceptibles a aquesta espècie de nematode. Una segona opció seria la utilització de *H. bacteriophora*, però caldria tenir en compte el retràs en la mortalitat de les larves per poder avaluar l'eficàcia en camp i el fet de que no provoquin mortalitats molt altes. Finalment, *S. feltiae* no seria una opció molt eficaç per al control de *T. pityocampa* degut a que aquesta demostra poca susceptibilitat a l'espècie. Tot i això, la mortalitat produïda per la soca utilitzada de *S. feltiae* ha estat gran en comparació a la obtinguda en altres casos: Triggiani i Tarasco (2001) van obtenir una mortalitat d'un 5,5 % per una soca d'Alemanya, i mortalitats d'un 16,6 i 15,8% en soques italianes. Cal dir que els assajos realitzats per Triggiani i Tarasco es van fer en camp, amb la qual cosa les condicions no van ser tant estables com les de laboratori. Tot i això, es pot comprovar que la soca PA provoca una major mortalitat en *T. pityocampa* que altres soques.

Per una altra banda, si s'avaluen les diferències de mortalitat per espècie es pot veure que no caldria esperar-se a fer un control de mortalitat al desè dia després de la infecció, ja que la mortalitat varia molt poc respecte el 4t dia, i les dades obtingudes són suficientment significatives per determinar la susceptibilitat de *T. pityocampa* a les espècies de nematode utilitzades. Tot i això, podria avaluar-se la possibilitat de fer un control per *H. bacteriophora* ja que els resultats són molt ajustats.

Les diferències de mortalitat causades per les diferents espècies de nematode podrien ser degudes a les preferències dels nematodes pels diferents insectes. *Steinernema carpocapsae* és particularment efectiu contra les larves de lepidòpters, a diferència de *S. feltiae*, que ataca principalment a larves de dípters. En el cas de *H.*

bacteriophora, es tracta d'una espècie amb una gran versatilitat, de manera que pot atacar larves de lepidòpters, coleòpters i altres insectes (Garcia del Pino, 2005). Això ens mostra que els resultats obtinguts són coherents amb les característiques de cada una de les espècies: *S. carpocapsae* és la que té més afinitat amb els lepidòpters, i podria ser per aquest motiu que ha estat la que ha provocat majors mortalitats; *S. feltiae* prefereix larves de dípters, i per tant, la mortalitat que ha provocat en *T. pityocampa* ha estat menor que les altres dues espècies. En el cas de *H. bacteriophora* no té preferències especials, de manera que produeix mortalitat en diferents insectes, i en el cas de *T. pityocampa* ha produït mortalitats importants. Això porta a corroborar que *S. carpocapsae* segueix sent la millor opció per al control de *T. pityocampa*, seguit de *H. bacteriophora*, i com a última opció es podria utilitzar *S. feltiae*.

Per avaluar si *T. pityocampa* és més susceptible a les diferents espècies de nematode que altres lepidòpters, cal comparar la mortalitat produïda en diferents espècies.

Si es compara la mortalitat produïda per *S. carpocapsae* en *T. pityocampa* amb la produïda en altres lepidòpters es poden veure diferents resultats: per altres plagues de pins, com ara *Rhyacionia frustana*, que també s'alimenta de les seves fulles, la soca DD-136 provoca mortalitats de entre un 15 i un 35% per concentracions de 4×10^3 nematodes/ml en assajos de camp (Nash i Fox, 1969). En altres lepidòpters que ataquen altres plantes, com ara *Thyridopteryx ephemeraeformis*, que s'alimenta de les fulles del gènere *Tuja*, s'observen mortalitats d'un 93% en laboratori per concentracions de 200 nematodes/cm² (Gill i Raupp, 1994). Cal tenir en compte que totes dues dosis són molt més elevades que les utilitzades per a l'assaig amb *T. pityocampa*, ja que es van utilitzar dosis de 12 nematodes/cm² obtenint una mortalitat del 95%. Per tant, es podria afirmar que *T. pityocampa* és més susceptible a *S. carpocapsae* que altres lepidòpters a menors concentracions.

Per una altra banda, fent comparacions per altres lepidòpters en el cas de *S. feltiae* s'observa que en general funciona millor: en el cas de *Lymantria dispar*, que ataca el gènere *Quercus*, provoca mortalitats en camp entre un 0 i un 74%, a concentracions de 538 nematodes/cm² (Reardon et al, 1986), i en el cas de *T. ephemeraeformis* provoca mortalitats en laboratori d'un 85% a concentracions de 200 nematodes/cm² (Gill i Raupp, 1994). Així doncs, les larves de *T. pityocampa* són menys susceptibles a *S. feltiae* que altres lepidòpters, però també cal tenir en compte les baixes concentracions que es van utilitzar en el cas de les larves de processonària, ja que podria ser el motiu de les diferències en la mortalitat.

Si es compara la mortalitat produïda per *H. bacteriophora* en *T. pityocampa* amb la produïda en altres lepidòpters, es pot veure que en *Macronoctua onusta* provoca mortalitats d'un 91% en camp, a concentracions de 46 nematodes/cm² (Gill i Raupp, 1997). En aquest cas es pot observar com a baixes concentracions l'espècie és molt efectiva. La soca utilitzada en l'assaig amb *M. onusta* és diferent que la utilitzada en els assajos de susceptibilitat amb les larves de processonària, i aquest podria ser el motiu de la disparitat de resultats.

Per tant, les larves de processonària són més susceptibles a *S. carpocapsae* i menys susceptibles a *S. feltiae* i *H. bacteriophora* que altres espècies de lepidòpter.

2.2. Avaluació de les larves de *Thaumetopoea pityocampa* com a hostes per als nematodes entomopatògens.

Un cop vista la susceptibilitat a les diferents espècies de nematodes entomopatògens de *Thaumetopoea pityocampa*, cal avaluar la producció de nematodes de l'espècie. Aquest assaig determina la idoneïtat com a hostes de les larves de processionària, fet que determina també quina de les tres espècies de nematode es reproduïx millor en el seu interior, i per tant, quina seria millor per garantir una multiplicació de la dosi inicial aplicada en casos de control en camp de la plaga.

Cal dir que actualment no hi ha publicacions on es reculli la producció de nematodes de *T. pityocampa*, per tant, es faran comparacions amb la producció d'altres lepidòpters.

2.2.1. Materials i mètodes

En aquest assaig s'han utilitzat les mateixes soques de nematodes que en el de susceptibilitat, i el procediment d'extracció de les larves de processionària ha estat el mateix. Cal esmentar que per poder avaluar la productivitat de nematodes de *T. pityocampa* s'ha realitzat un assaig paral·lel amb larves de *Galleria mellonella*, ja que aquest lepidòpter és molt bon hoste per a la producció de nematodes entomopatògens, i és per aquest motiu que és molt bo per fer comparatives de producció.

Larves de *G. mellonella*

Les larves de *G. mellonella* utilitzades en l'assaig han estat criades en el mateix laboratori basades en una dieta artificial específica (com. pers., Garcia del Pino). S'han escollit les larves d'últim estadi abans de fer el capoll per pupar, les quals es van anar seleccionant una a una. Cada una de les larves va ser degudament pesada i introduïda en una placa de petri.

Assaig de laboratori

L'assaig es va dur a terme en plaques de petri de 5 cm de diàmetre, en les quals es van introduir dos retalls de paper de filtre esterilitzats. Es varen realitzar 2 sèries de 15 repeticions per espècie de nematode. En la repetició de l'assaig es va decidir introduir una sèrie més per cada espècie. En el cas de l'assaig amb les larves de processionària es va realitzar una sèrie de 15 larves per cada espècie de nematode, de manera que el total de les larves de processionària utilitzades va ser 45.

Un cop totes les larves van estar distribuïdes, es van introduir els nematodes a cada una de les plaques. La dosi d'infecció utilitzada va ser de 100 nematodes per placa, equivalent a 5,04 nematodes/cm². Es va afegir 1 ml d'aigua de l'aixeta estèril a totes les plaques per humitejar els papers de filtre. En els casos en que en inocular els nematodes es superés ja aquesta quantitat, es van afegir tants retalls de paper de filtre com van ser necessaris perquè no hi hagués un sobrant d'aigua a la placa.

Finalment, les plaques es van guardar en una cambra de cultiu a 25°C fins a la mort de les larves. En el cas de *Galleria*, es van extreure les larves de la cambra de cultiu passats els 5 dies, però en *Thaumetopoea* es van esperar 10 dies, ja que els nematodes entomopatògens tarden més en matar les larves de processionària, tal com s'ha pogut comprovar en l'assaig de susceptibilitat. De les larves de *G. mellonella* obtingudes, es va reservar una de les sèries de cada espècie de nematode per avaluar la producció amb un tractament diferent de les larves, i en el cas de la repetició de l'assaig, se'n van reservar dues. Així, en aquest assaig es varen utilitzar també 45 larves de *G. mellonella* per avaluar la seva producció.

Un cop separades les larves, les 45 larves de cada una de les dues espècies de lepidòpter es van transferir una a una a plaques d'extracció de nematodes, on es produïa la sortida de les formes infectives (Figures 12 i 13). Aquestes eren recollides setmanalment i guardades en pots degudament retolats per al seu còmput final. Les mostres es van haver de fixar amb TAF (Formol + Trietanolamina + aigua destil·lada) per evitar la descomposició dels nematodes en morir i poder realitzar el còmput de manera fiable.



Figura 12: Sortida massiva de *S. carpocapsae* del cadàver d'una larva de processionària. Es pot observar que degut a la duresa de la seva cutícula, els nematodes surten per la boca.



Figura 13: Juvenils infectius de *S. carpocapsae* que han sortit d'una larva de *T. pityocampa*. Es pot observar el comportament d'emboscada, pel qual els nematodes es redrecen sobre si mateixos sobre la superfície que es troben per localitzar l'hoste.

Recomptes de formes infectives

Per calcular la concentració de nematodes per gram de larva, primer es va dur a terme el càlcul de la producció total de la larva, calculant la concentració de nematodes/ml. Els recomptes es varen fer amb una càmera de comptatge, diluint la concentració de nematodes fins a obtenir-ne uns 20-25 per cada requadre de la càmera, el volum dels quals era de $0,1125 \text{ cm}^3$. Es varen fer 10 repeticions per mostra en tots els casos, i es varen descartar sempre el nombre més gran i el més petit per reduir els biaixos a l'hora de fer els càlculs. Un cop obtinguda la concentració, es multiplicava pel total de ml de la mostra. Cal dir que totes les mostres es van enrasar a 104 ml prèviament als recomptes. Finalment, un cop trobada la producció de nematodes per larva, es va dividir pel pes de la larva per obtenir la quantitat de nematodes/gr.

Anàlisi estadístic

Previ al tractament de les dades es van realitzar dues transformacions de les mateixes: pel arccosinus de l'arrel de la producció de nematodes/gr., i pel logaritme de la producció de nematodes/gr. Un cop fetes les transformacions es va avaluar si seguien una distribució normal tenint en compte un nivell de significació de $P \leq 0,05$. Donat que el resultat va ser negatiu es van haver d'aplicar proves no paramètriques.

L'avaluació de les diferències entre la producció de *G. mellonella* i *T. pityocampa* es va fer mitjançant un anàlisi aplicant Kolmogorov – Smirnov per dues mostres independents (N-PAR TESTS, K-S, SPSS-PC), aplicant un nivell de significació per $P \leq 0,05$.

2.2.2. Resultats

La producció de formes infectives entre les larves de *G. mellonella* i les de *T. pityocampa* ens mostren en general diferències importants (Figura 14).

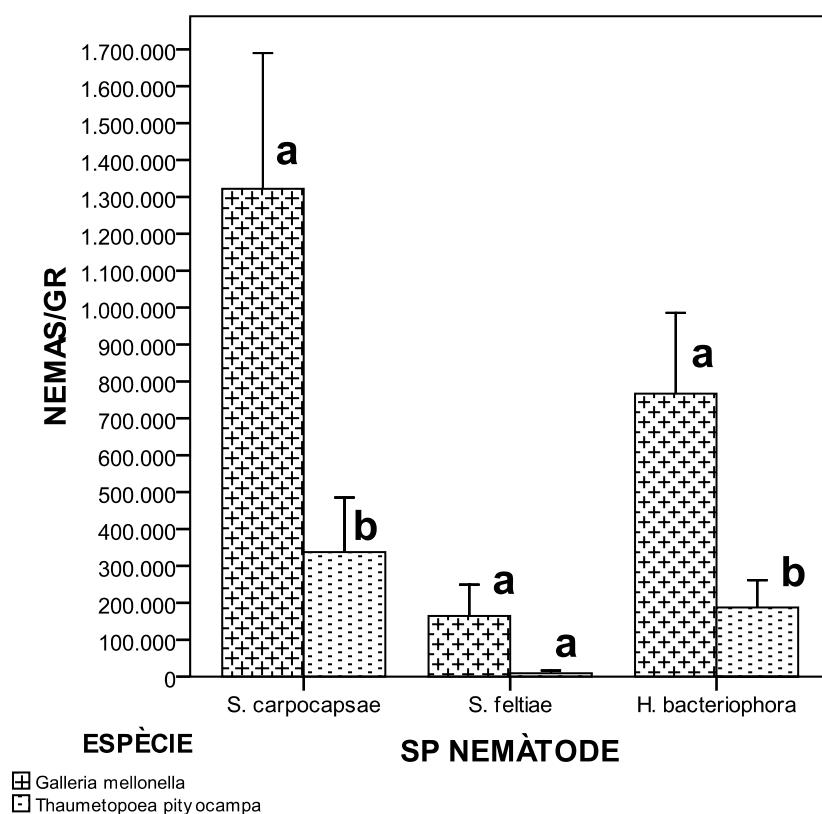


Figura 14: Producció de nematodes/gr. de larva agrupada per espècie de nematode i per espècie de larva (les barres mostren les mitjanes de mortalitat i les barres d'error, la desviació típica; les mitjanes que tenen la mateixa lletra no són significativament diferents; $P < 0,05$, N-Par Test, K-S).

A grans trets s'observa que el comportament de les espècies de nematodes és el mateix en les dues espècies d'insecte: *S. carpocapsae* és el que té una producció més gran, seguit de *H. bacteriophora*. *Steinernema feltiae* ha estat la soca amb menor producció de les tres en tots dos casos.

Si s'avalua si hi ha diferències significatives en la producció per espècie de nematode, comparant les dues espècies d'insecte utilitzats es pot veure que per *S. carpocapsae* les diferències de producció són significativament majors en larves de *G. mellonella* que en larves de processionària (K-S Test: $Z=3,017$, $P=0,000$).

En el cas de *S. feltiae*, les diferències entre larves de processionària i de l'arna de la cera no són significatives (K-S Test: $Z=1,359$, $P=0,050$), tot i l'ajust dels resultats.

Per una altra banda, *H. bacteriophora* té una producció significativament més elevada en el cas de les larves de l'arna de la cera que en processionària (K-S Test: $Z=1,690$, $P=0,007$).

2.2.3. Discussió

Els resultats de l'avaluació de la producció entre *G. mellonella* i *T. pityocampa* mostren que les larves de *G. mellonella* són molt més productores de nematodes que les de *T. pityocampa*. Cal tenir en compte que les larves de l'arna de la cera són molt susceptibles als nematodes entomopatògens, de manera que no hi ha cap problema a l'hora de produir-se la infecció.

En el cas de les larves de processionària el procés d'infecció és més delicat. *H. bacteriophora* i *S. feltiae* tarden molt més en matar la larva, i de la mateixa manera, en el cas de que ho aconseguixin, tarden més en reproduir-se i arribar a formar-se les formes infectives. La diferència que hi ha entre el temps que tarden en desenvolupar-se pot ser degut al pes de les larves: les de l'arna de la cera utilitzades per als assajos pesaven una mitjana de 0,2808 gr., i les de processionària, 0,4642 gr., per tant, els nematodes tenen més aliment en les larves de *T. pityocampa*, i es reproduiran més abans de produir una generació de juvenils infectius.

En els assajos anteriors es va observar que tant en *S. carpocapsae* com en *H. bacteriophora* s'arribava a desenvolupar fins a una 3a generació sense desenvolupar-se els juvenils infectius. En el cas de *S. feltiae*, no es va observar una reproducció molt massiva de nematodes en el seu interior, es van poder apreciar alguns adults en les disseccions però no es va trobar un creixement i reproducció massius com en els altres dos casos.

Això es tradueix en que en l'assaig de producció de nematodes per processionària algunes de les larves que havien mort no van produir nematodes: per *H. bacteriophora* es van haver de descartar 3 larves que havien mort per fongs, i 7 larves més que no van produir nematodes, algunes de les quals s'havien convertit ja en pupa i continuaven vives. En el cas de *S. feltiae* es van descartar 13 larves, una de les quals havia mort per fongs i dues més que havien pupat. Per tant, en les larves que no es va observar producció podria ser degut a una mala reproducció dels nematodes en l'interior del insecte. Per tant, es pot suposar que les larves de processionària sí són susceptibles als nematodes entomopatògens, però no són hostes molt bons per a *H. bacteriophora* i *S. feltiae*. A l'hora de fer el treball de camp caldria tenir en compte aquest fet, ja que tenint en compte que la reproducció de nematodes pot donar un efecte multiplicador de la dosi inicial aplicada (Garcia del Pino, 2005), si els nematodes no es reproduïen molt bé es perdria aquest punt que afavoriria un augment de la mortalitat en les colònies.

Per una altra banda, si fem una comparació entre la producció de les larves de *T. pityocampa* i *G. mellonella* amb les larves d'un altra lepidòpter es pot veure diferències en la producció. Si s'avalua la producció de nematodes/gr. de *S. carpocapsae* en el cas de *Gortyna xanthenes* es pot veure que amb una dosi de 100 nematodes per larva, igual que en els assajos realitzats anteriorment, la producció mitjana és de 520.896 ± 291.468 nematodes/gr. (Garcia del Pino, 1988). En el cas de *T. pityocampa*, la producció és de 337.310 ± 147.993 nematodes/gr. Per tant, es pot dir que les larves de processionària són pitjors hostes per als nematodes entomopatògens que *G. mellonella* i *G. xanthenes*, ja que la seva producció és menor que la dels altres dos lepidòpters.

Finalment, un altre motiu pel qual la producció de processionària és menor a la de la arna de la cera podria ser degut a la duresa de la cutícula del insecte. El tegument de les larves de processionària és molt més dur que el de les larves de l'arna de la cera, probablement degut a que les larves de processionària han d'enterrar-se en el sòl per poder completar el seu cicle biològic, i per tant, necessiten una recoberta del cos suficientment resistent. Aquest fet dificulta la sortida dels juvenils infectius, que escullen els orificis naturals per sortir cap a l'exterior, i tarden molt més en fer-ho que en el cas de *G. mellonella*.

3. Aplicació dels nematodes entomopatògens contra les larves de *Thaumetopoea pityocampa* en el camp.

3.1. Àrea d'estudi

3.1.1. Història i localització

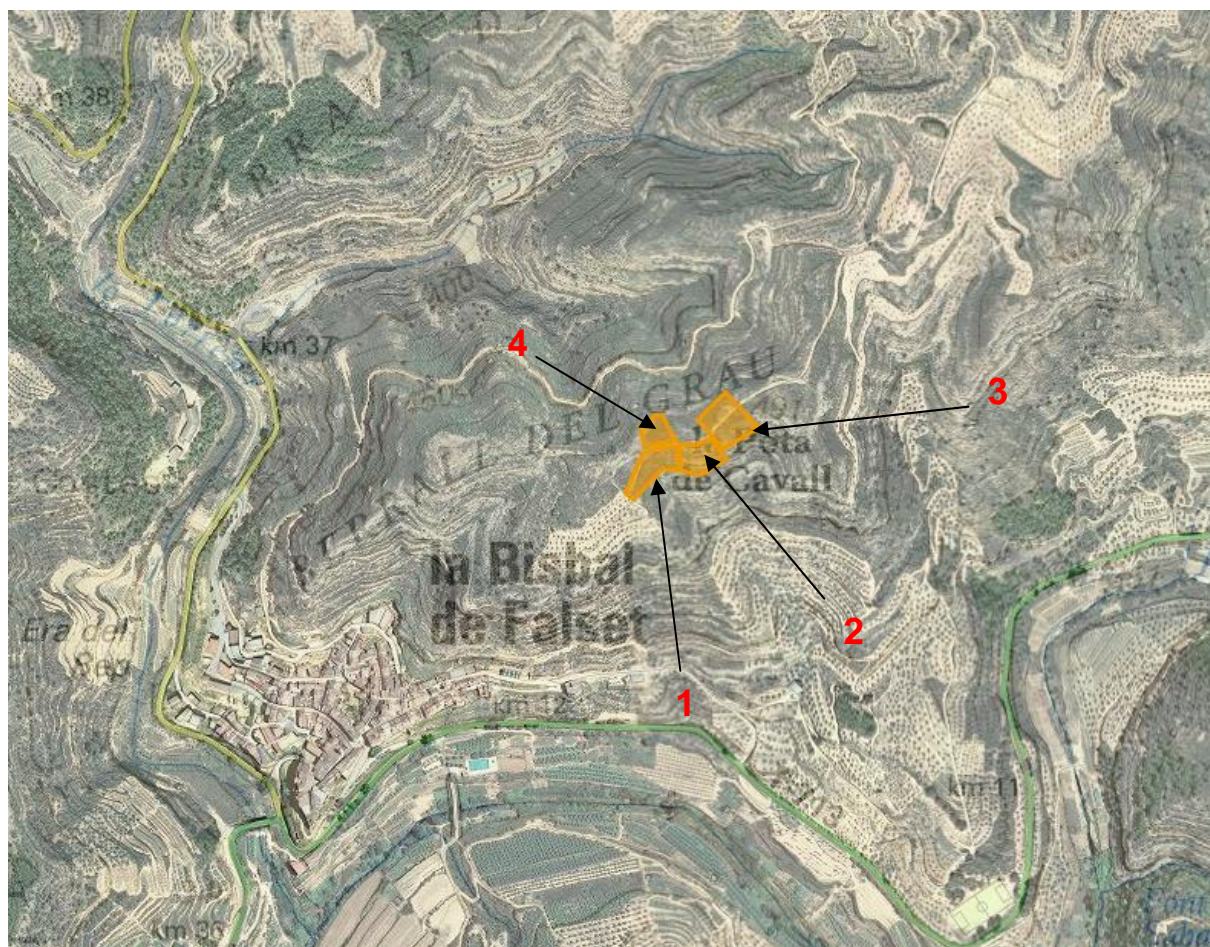
L'àrea d'estudi necessària per a dur a terme els assajos de camp havia de complir les pautes següents: la zona havia d'estar suficientment afectada per la plaga per poder tenir un nombre significatiu de colònies en una àrea no molt extensa i els arbres havien de tenir una altura mitjana per a poder accedir-hi des del terra sense haver d'utilitzar estris per enfilars-s'hi. Per facilitar el treball, es va decidir buscar una zona adequada no molt llunyana, considerant la opció de buscar-la en el terme municipal de la Bisbal de Falset.

Aquesta població va patir un incendi el dia 16 de juny de l'any 1994. Aquest es va originar a l'abocador de la localitat, on es va estendre ràpidament amb el vent, pujant carena amunt fins arribar al capdamunt del Serrall del Grau i continuant cap a l'oest fins arribar al terme municipal de Margalef de Montsant. La vegetació dels boscos de la zona estava formada principalment per boscos de *Pinus halepensis* amb un dens estrat arbustiu típicament mediterrani. Amb aquest incendi es varen cremar 56 ha arbrades, principalment camps de conreu, 16 ha no arbrades i 76 ha forestals del terme de la Bisbal, i 6 ha arbrades i 6 més de zona forestal del terme municipal de Margalef (Generalitat de Catalunya, Dept. de Medi Ambient).

D'aquesta manera, es va decidir escollir un bosc de rebrotada situat al nord-oest de la Bisbal de Falset, situat en el Serrall anomenat anteriorment i a pocs metres de la roca anomenada "la Pota de Cavall" (Figura 15). Després de 15 anys, a l'àrea d'estudi s'hi troba un bosc esclarissat de *P. halepensis*, amb un estrat arbustiu desenvolupat, format principalment per gatosa (*Ulex parviflorus*), garric (*Quercus coccifera*), arboç (*Arbutus unedo*) i plantes aromàtiques com el romer (*Rosmarinus officinalis*) i la farigola (*Thymus vulgaris*). Per tant, la zona és idònia per a l'assaig de camp.

Es van efectuar diferents divisions per a fer el treball necessari: la parcel·la 1 (coordenades 31 T 0309756, 4572740, precisió 6m) mesurava 1935,6 m² i estava situada a 483 m d'altitud sobre el nivell del mar, i la parcel·la 2 (coordenades 31 T 0309703, 4572705, precisió 5m), mesurava 2185 m² i estava situada a 477m d'altitud. La parcel·la designada per a fer l'assaig amb polvoritzador ocupava una àrea de 1182,7 m², i en el cas de la parcel·la de repetició de la primera varen ser necessaris 2954 m² per encabir totes les colònies necessàries per a l'assaig.

Figura 15: Localització de l'àrea d'estudi. En taronja, les parcel·les en que es va dividir la zona per als diferents estudis, indicades amb nombres diferents (1: parcel·la 2 (P2), 2: parcel·la 1 (P1), 3: repetició P1, 4: parcel·la polvoritzador). *Font mapa base: ICC*



Escala 1:10.000



3.1.2. Anàlisi del contingut de nematodes entomopatògens dels sòls de l'àrea d'estudi.

La finalitat d'aquest anàlisi de sòls va ser avaluar si hi havia presència d'alguna espècie de nematode entomopatògen al sòl per poder controlar que les parcel·les de l'estudi estaven lliures de nematodes entomopatògens que poguessin interferir amb els nematodes aplicats en l'assaig de camp.

Mostreig de camp

Es van mostrejar els sòls de la P1 i P2. Els mostrejos es van dur a terme a cada una de les zones marcades per als diferents assajos amb les 3 espècies de nematode i el

control, per tant, es van dividir les parcel·les en 4 trossos diferents. Es va mostrejar en total 1 m² de cada una de les parcel·les. Un cop mostrejats els sòls, es van dur les mostres al laboratori per dur a terme l'assaig de determinació del contingut en nematodes.

Assaig al laboratori

L'assaig va consistir en omplir 5 plaques de petri de 9 cm de diàmetre per cada una de les mostres de terra recollides. En acabat, es va introduir una larva de *Galleria mellonella* en cada una, es van deixar cap per avall i es van col·locar en una safata tapada per conservar la humitat. Es van deixar a 23°C durant 7 dies, i passat aquest temps, es van fer els controls de totes les plaques. Quan el resultat era negatiu, es repetia l'assaig un altre cop.

Resultats

Amb els controls de les plaques es va observar que les larves de *G. mellonella* que havien mort havia estat a causa dels fongs presents al sòl. Aquest fet es va donar en 4 larves en la primera repetició, però la resta de larves continuaven vives. Degut als resultats negatius, es va tornar a repetir l'assaig. En la segona repetició no es va observar la mortalitat de cap larva per fongs, i totes continuaven vives. Per tant, es pot veure que en els sòls de l'àrea d'estudi no hi ha cap espècie de nematode entomopatògen autòctona.

3.2. Avaluació del mètode d'aplicació dels nematodes entomopatògens.

3.2.1. Introducció

Els nematodes entomopatògens poden ser aplicats amb els sistemes més convencionals d'aplicació en líquid dissenyats per repartir fertilitzants i pesticides, i amb irrigació (Grewal, 2002). A l'hora de seleccionar quin sistema s'ha d'escollir s'ha de tenir en compte el volum, el sistema d'agitació, la pressió i el temps de reciclatge, les condicions ambientals del sistema, i la distribució de les gotes de l'esprai (Shetlar, 1999).

Es poden fer aplicacions superficials o no superficials: en les primeres s'utilitzen els sistemes ja anomenats anteriorment amb diferent maquinaria, ja sigui amb tractors amb bombes d'ensulfatar o amb pistoles manuals, passant per esprais manuals. Per una altra banda, les aplicacions subsuperficials es fan mitjançant injectors o amb una xeringa hipodèrmica.

Es poden trobar també diferents medis d'aplicació: el més habitual és inocular els nematodes en suspensió aquosa, però també s'han utilitzat altres productes, com ara gels. Triggiani i Tarasco (2002) varen utilitzar un gel basat en 10 g del polímer acrílic Idrosorb SR 2002 (Nigem[®]) i 1L d'aigua, i també varen provar l'efectivitat dels nematodes amb un gel de silicona ja preparat anomenat Compex gel[®].

En la present investigació s'ha provat un nou mètode d'aplicació mitjançant cadàvers de *G. mellonella*, ja que alguns estudis de laboratori indiquen que l'aplicació amb cadàvers infectats ajuda a una major dispersió (Shapiro i Glazer, 1996), infectivitat (Shapiro i Lewis, 1999) i supervivència (Perez *et al.* 2003). Shapiro *et al.* (2003) van observar un 100% de mortalitat al cap de 28 dies de l'emergència dels nematodes de cadàvers de *Tenebrio molitor*, de manera que aquesta era més gran que la mortalitat provocada per un tractament inoculant els nematodes amb esprai.

Tenint en compte això, s'han introduït els cadàvers de *G. mellonella* en càpsules eppendorf i s'ha avaluat la viabilitat d'aquest mètode alternatiu. La finalitat d'aquest assaig també ha estat determinar la dosi d'aplicació en camp a partir de les dades de producció obtingudes.

3.2.2. Materials i mètodes

Les larves de *G. mellonella* utilitzades en aquest assaig van ser les que es van reservar passats els 5 dies de la inoculació dels nematodes entomopatògens a les plaques preparades per al primer assaig de producció. Per poder fer una comparativa entre tots els tractaments, cal dir que també s'han utilitzat els resultats de producció de les larves de *G. mellonella* ja comentats anteriorment per a comparar-les amb les dades de producció obtingudes en aquest assaig. D'aquesta manera es pot determinar si el fet d'utilitzar càpsules eppendorf té influències sobre la sortida de nematodes o no.

Tractaments de les larves

Les larves es varen dividir en dos tractaments: en un es va utilitzar una càpsula eppendorf amb 20 forats a les parets de la qual s'havia extret també la part inferior. Els forats es van fer amb un fil d'acer de 2 mm de diàmetre escalfat per tal de que la càpsula no s'esquerdés en foradar-la, i la part inferior es va tallar amb l'ajut d'un cúter. Per una altra banda, en l'altre tractament es van utilitzar càpsules eppendorf en les quals només s'havia extret la part inferior. Aquest últim tractament es va fer per recollir dades addicionals sobre la viabilitat d'un possible tractament amb aquest sistema, i per aquest motiu es va fer amb la sèrie de larves que es va introduir de més en la repetició de l'assaig en el que es van infectar les larves. (Figures 16, 17 i 18)

Cal dir que la manera d'extreure els nematodes va ser la mateixa que en l'assaig de producció de nematodes de *T. pityocampa*, i que també es va anar recollint setmanalment el contingut de nematodes de les plaques d'extracció durant 3 setmanes. Es va optar també pel mateix mètode de conservació dels nematodes fins al seu recompte, i també pel mateix sistema de comptatge.



Figura 16: Sortida massiva de les formes infectives de *H. bacteriophora* d'una larva de *G. mellonella*. Aquestes s'aprecien sobre la cartolina negra i sobre la càpsula eppendorf. Es pot observar amb detall el eppendorf perforat per al tractament.



Figura 17: Sortida massiva de les formes infectives de *S. feltiae* d'una larva de *G. mellonella*. En aquest cas els nematodes s'han concentrat sobre la càpsula eppendorf.



Figura 18: Sortida massiva de les formes infectives de *S. carpocapsae* d'una larva de *G. mellonella*. S'observa com els nematodes s'agrupen en cordills, comportament molt típic en ells. També es pot veure l'altra opció per al tractament amb càpsules eppendorf.

Anàlisi estadístic

Abans del tractament de les dades es ven realitzar les transformacions pel arccosinus de l'arrel de la producció de nematodes/gr., i pel logaritme de la producció de nematodes/gr. En avaluar si seguien una distribució normal es van observar resultats negatius, amb el qual es van haver d'aplicar altre cop proves no paramètriques. Les dades es van avaluar primerament mitjançant Kruskal – Wallis per K mostres independents (N-PAR TESTS, K-W, SPSS-PC) per avaluar si hi havia diferències estadísticament significatives entre espècies en general. Per avaluar si hi havia diferències significatives entre els tipus de tractament per cada espècie de nematode es va aplicar Kolmogorov – Smirnov per dues mostres independents (N-PAR TESTS, K-S, SPSS-PC), de manera que es podia avaluar si hi havia diferències per parells de tractament.

3.2.3. Resultats

La producció de nematodes/gr. de larva en el cas de *G. mellonella*, agrupada per espècies i els diferents mètodes d'aplicació de la larva (amb càpsula perforada, càpsula amb un sol forat o sense càpsula) es pot observar en la Figura 19:

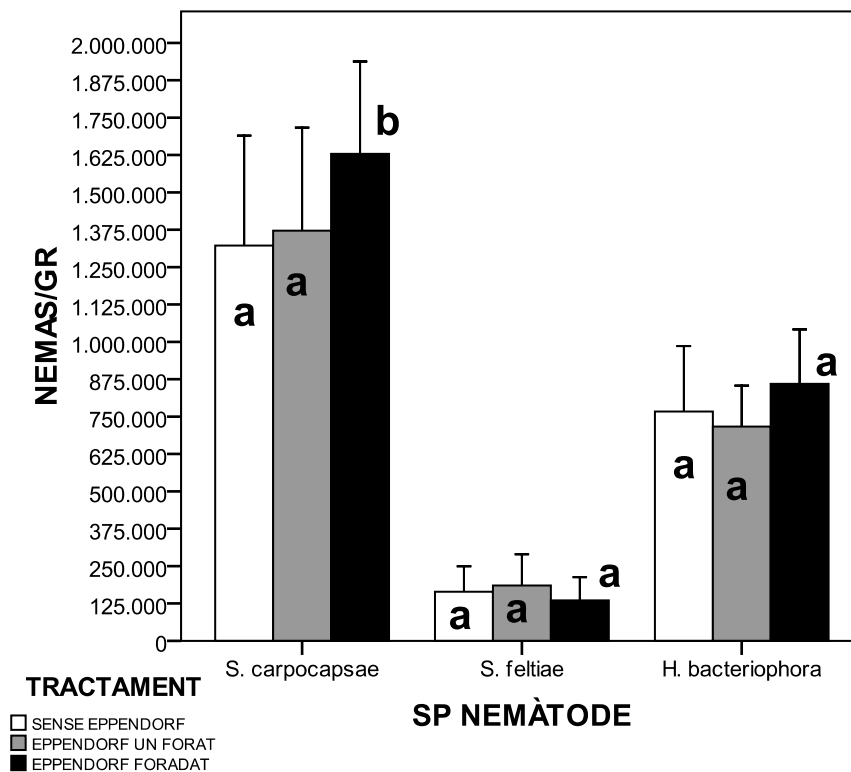


Figura 19: Producció de nematodes/gr. de larva de *G. mellonella* agrupada per tipus d'aplicació i espècie de nematode (les barres mostren les mitjanes de mortalitat i les barres d'error, la desviació típica; les barres dins d'una mateixa espècie que tenen la mateixa lletra indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre tractaments; $P \leq 0,05$, N-Par Test, K-W).

En general, es pot veure que, independentment del tipus d'aplicació de la larva la producció de formes infectives per les diferents espècies de nematodes és significativament molt diferent (Kruskal - Wallis Test: $P=0,000$). Es pot observar que la producció de *S. carpocapsae* és molt més gran que la produïda per les altres dues espècies.

Els resultats mostren que hi ha diferències estadísticament significatives entre la producció per als diferents tractaments de *S. carpocapsae* (K - W Test: $P=0,002$). En canvi, no hi ha diferències estadísticament significatives entre la producció de nematodes dels diferents tractaments de *S. feltiae* (K-W Test: $P=0,212$) i tampoc en *H. bacteriophora* (K-W Test: $P=0,063$).

Si avaluem les diferències per parelles, en el cas de *S. carpocapsae* es pot veure que no hi ha diferències significatives entre les larves tractades sense eppendorf i les que estaven dins un eppendorf amb un forat (Kolmogorov – Smirnov Test: $Z=0,720$, $P=0,678$), però sí que hi ha diferències significatives entre la producció d'aquestes i les que es troben dins un eppendorf foradat (K – S Test: $Z=1,370$, $P=0,047$) i entre la producció d'aquestes últimes i les larves sense eppendorf (K – S Test: $Z=1,742$, $P=0,005$), la qual cosa ens mostra que la producció en eppendorf foradat és significativament superior a la dels altres tipus d'aplicació.

En el cas de *S. feltiae* no hi ha diferències significatives per cap tractament: avaluant per parelles es veu que no hi ha diferències entre la producció sense eppendorf respecte la producció amb eppendorf amb un forat (K-S Test: $Z=0,612$, $P=0,847$), i tampoc en el cas de la producció sense eppendorf i amb l'eppendorf foradat (K-S Test: $Z=1,322$, $P=0,061$), però en el cas de la producció amb eppendorf foradat i amb un sol forat els resultats són molt ajustats tot i no haver-hi diferències significatives (K-S Test: $Z=1,349$, $P=0,053$). Si s'observen les mitjanes, tot i no haver-hi diferències significatives es pot apreciar una producció una mica per sobre en el cas del tractament amb l'eppendorf amb un forat.

La producció de *H. bacteriophora* avaluada per parelles confirma els resultats obtinguts en la primera avaluació de les dades per K-W: comparant la producció entre tractament sense eppendorf i amb l'eppendorf amb un forat es pot veure que no hi ha diferències significatives (K-S Test: $Z=0,701$, $P=0,710$), de la mateixa manera que comparant la producció entre el tractament sense eppendorf i l'eppendorf foradat (K-S Test: $Z=0,776$, $P=0,584$), i també comparant la producció entre els dos tractaments amb eppendorf (K-S Test: $Z=1,139$, $P=0,150$). Tot i això, la mitjana de la producció pel tractament de l'eppendorf foradat és superior a la dels altres dos, seguida pel tractament sense eppendorf. El tractament amb eppendorf amb un forat en aquest cas és la que ha donat menor producció.

3.2.4. Discussió

Els resultats ens mostren que l'espècie de nematode que produeix més formes infectives és *S. carpocapsae*. Tenint en compte que en assajos anteriors s'ha comprovat la seva eficàcia amb *T. pityocampa* seria la millor opció a l'hora de fer els assajos de camp

Avaluant la productivitat per cada un dels tractaments es pot extreure que l'aplicació de capsules eppendorf no disminueix la producció de nematodes, com potser es podria pensar tenint en compte que els nematodes han de traspasar una barrera física per poder buscar possibles hostes. La producció de nematodes en els casos en que la larva es trobava dins una capsula eppendorf no és significativament menor en cap cas, i sí que és significativament superior en el cas de les infectades per *S. carpocapsae* i encapsulades en eppendorf foradat. En el cas de *H. bacteriophora*, la mitjana de la producció/gr. en el eppendorf foradat és superior a la de la resta, encara que no sigui significativament diferent.

Així doncs, s'observa un efecte beneficiós de la càpsula sobre la sortida de nematodes. Aquest efecte podria ser donat per la menor incidència del creixement de bacteris o fongs sobre els cadàvers encapsulats. Durant l'assaig es va poder observar creixement de bacteris en les plaques d'extracció de nematodes on la larva es dipositava directament sobre el paper de filtre. Aquests creaven una pel·lícula gelatinosa sobre l'aigua que dificultava la sortida dels juvenils infectius, disminuint molt la producció de la larva. En el cas de les plaques on el cadàver de *G. mellonella* es trobava encapsulat el creixement de bacteris no es donava, o es donava amb menor freqüència, de manera que els juvenils podien sortir del cadàver amb facilitat en la majoria de casos. La càpsula podria evitar contagis del cadàver de la larva amb

bacteris o fongs presents als nius de processionària, la qual cosa podria facilitar la sortida i posterior infecció de les larves. El fet de recobrir la larva amb alguna protecció millora el maneig i la viabilitat de l'aplicació, i evita els danys físics resultants de la fricció i la ruptura del cadàver del insecte. Aquest recobriment també ajuda a disminuir l'estrès generat per condicions ambientals adverses (Del Valle et al., 2009). Les càpsules podrien evitar també que les larves de processionària provoquessin danys en el cadàver de *G. mellonella*.

Respecte a les diferències entre eppendorf foradat i eppendorf nomes amb un forat, nomes s'aprecien diferències significatives en el cas de *S. carpocapsae*. Tenint en compte això, ja que el procediment de fer els forats als eppendorf és lent, es podria pensar que en casos d'aplicacions en grans quantitats seria més viable la opció de la utilització de càpsules amb un sol forat a la part inferior. Una possible via d'aplicació seria utilitzar una carrabina d'aire comprimit: Rejat (1998) va utilitzar per al seu assaig amb balins de deltametrin carrabines d'aire comprimit per pistó i molla de calibre 4,5 i 5,5. Una manera de fer les proves de camp seria utilitzar una càpsula que s'adaptés a les carrabines, d'una resistència suficientment gran per aguantar el tret, degudament perforada. Caldria avaluar si la larva de *G. mellonella* pateix algun dany amb el tret per assegurar la viabilitat del mètode d'aplicació.

Per tant, i tenint en compte les observacions anteriors, el mètode que es va decidir utilitzar per als assajos de camp va ser la utilització de les càpsules eppendorf foradades, ja que la quantitat de colònies necessàries per a l'assaig és suficientment petita per utilitzar aquest mètode.

A partir de les dades de producció anteriors es pot determinar la dosi a aplicar en cada una de les colònies de processionària. Triggiani i Tarasco (2002) utilitzen dosis que van des dels 100.000 als 300.000 nematodes per colònia per totes les espècies. Tenint en compte que és l'únic assaig que determina concentracions a utilitzar en camp s'ha utilitzat com a referència.

Si s'observen les mitjanes de producció per gr. de larva de *G. mellonella* veiem que *S. carpocapsae* produeix $1.628.872 \pm 309.124$ nematodes/gr., *S. feltiae* produeix 135.625 ± 77.253 nematodes/gr. i *H. bacteriophora*, 859.909 ± 181.846 nematodes/gr. Cal tenir en compte que aquestes produccions són per gr. de larva, per tant, per aconseguir el màxim de producció de nematodes en camp caldrà infectar larves de *G. mellonella* el més grans possible. Així doncs, la dosi a utilitzar en camp serà de una larva per colònia de *T. pityocampa*

3.3. Control de les larves de *T. pityocampa*: assaigs de camp.

3.3.1. Introducció

El següent assaig es va realitzar per determinar si els nematodes entomopatògens són efectius en camp de la mateixa manera que ho són en el laboratori. També es volia determinar si el mètode d'aplicació era viable. Per fer-ho, s'han realitzat dos tipus d'experiments: en un s'ha utilitzat un sistema de polvorització manual amb

esprai, utilitzant nematodes en suspensió aquosa, i en l'altre s'ha utilitzat l'aplicació de cadàvers de *G. mellonella* amb càpsules eppendorf. La funcionalitat dels assajos és comparar l'efectivitat del tractament amb càpsules, no provat anteriorment, amb el de polvorització, ja que s'ha vist que els nematodes en suspensió aquosa provoquen mortalitat en les colònies de *T. pityocampa* (Triggiani i Tarasco, 2002).

3.3.2. Materials i mètodes

Mesura de temperatures

Per tenir una idea aproximada si els nematodes entomopatògens podrien sobreviure a les baixes temperatures del camp, es mesurar les temperatures i la humitat a l'interior i a l'exterior dels nius durant un dia: les mesures es van prendre al matí, a la tarda i al vespre. Per una altra banda, es van mesurar les temperatures en el moment dels assajos de camp (Figures 20 i 21). L'aparell de mesura emprat va ser un termòmetre digital amb sonda.



Figura 20: Introducció de la sonda de temperatura i humitat en l'interior d'una colònia de *T. pityocampa*.



Figura 21: Detall de la presa de temperatures. Es mostra com ha de quedar introduïda la sonda en l'interior del niu i l'aparell utilitzat per a fer les mesures.

Larves de *Galleria mellonella*

Per dur a terme l'assaig de camp es van utilitzar 10 larves infectades per cada espècie de nematode. Per tal de poder escollir les larves que mostressin signes d'estar més ben infectades, es van realitzar infeccions de 20 larves de *G. mellonella* per cada espècie. Per fer-ho, es van distribuir de deu en deu en plaques de 9 cm de diàmetre amb dos retalls de paper de filtre degudament esterilitzat.

La concentració inoculada per placa va ser de 100 nematodes per larva, és a dir, una concentració de 50,9 nematodes/cm³. La inoculació es va dur a terme en dies diferents: una setmana abans de l'aplicació en camp es van fer les infeccions de les larves de *G. mellonella* amb *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora*, i 5 dies abans es va infectar amb *S. feltiae*. Aquesta diferència en el temps d'incubació es deu a que *S. feltiae* tarda menys en matar i reproduir-se dins la larva, i per tant, cal fer les infeccions en dies diferents per poder realitzar l'assaig de camp amb totes les soques el mateix dia. Les plaques es van col·locar en cambres de cultiu a 25°C, i es van retirar al cap d'una setmana.

Al cap del temps estipulat, es van introduir les larves de cada una de les espècies en càpsules eppendorf, i es van tornar a mantenir a 25°C durant 24 hores.

Marcatge de les colònies de *T. pityocampa*

Per a fer l'assaig de camp es varen utilitzar 40 colònies per parcel·la, 10 colònies per cada espècie de nematode i 10 més per al control. Cada una de les colònies subjectes a estudi es van marcar amb un tros de cinta aïllant enganxat a la rama on la colònia tenia el seu emplaçament, o a la rama més pròxima (figura 22).



Figures 22 i 23: A l'esquerra, colònia de processionària del pi degudament etiquetada i amb la càpsula en el seu interior. A la dreta, detall de la introducció d'una càpsula eppendorf en una colònia.

Es van utilitzar 4 colors diferents per poder diferenciar les espècies de nematodes utilitzades entre elles. En el cas de l'assaig amb polvoritzador es varen utilitzar 10 colònies per a la infecció i 10 més per al control. En aquest cas es varen marcar tots els arbres amb al mateix color però se'ls va assignar un codi diferent per a poder diferenciar-los entre si.

Assaigs de camp

Els assaigs de camp es van dur a terme per separat. La tercera setmana de gener es van infectar les colònies de la primera parcel·la, amb un ordre determinat: el dia programat per a l'aplicació en camp es van introduir en les colònies les càpsules amb *S. feltiae*, *S. carpocapsae* i les càpsules buides per al control. La càpsula eppendorf s'introduïa pressionant la capa de fils de seda que protegia la colònia fins que s'obria un forat, i la càpsula quedés totalment ajustada a la superfície, amb només la tapa fora per poder-la localitzar en futures observacions (Figura 23). Posteriorment es numerava l'etiqueta de la colònia i es prenia el diàmetre i l'alçada de la mateixa.

Per una altra banda, els cadàvers de *H. bacteriophora* es van mantenir a una temperatura de 25°C aproximadament fins que van començar a sortir els primers juvenils infectius, moment en que es realitzava l'aplicació. D'aquesta manera es garantia que aquesta espècie, que és sensible la dessecació i a la llum del sol (Grewal, 2002), completaria correctament el seu cicle biològic. L'assaig a la P2 es va dur a terme la última setmana de gener, i es va utilitzar el mateix procediment que en la parcel·la anterior.

Es fa fer només un control de mortalitat per a cada parcel·la. En el cas de la P1 es va dur a terme dues setmanes després de la primera infecció en camp, i en cas de la P2, es va fer un més després. Per a fer els controls es van recollir totes les colònies i es van dipositar individualment en bosses de plàstic degudament etiquetades. En el cas de la P1 es varen portar al laboratori, on es van fer els recomptes sota una campana per evitar la dispersió de les espícules. Per una altra banda, es va observar a la lupa si els nematodes havien sortit a l'exterior dels eppendorf. Un cop fet això, es van dissecar totes les larves de *G. mellonella* per veure l'estat en que es trobaven els nematodes. Pel que fa al control de mortalitat de la P2, es va fer *in situ* per major comoditat.

Durant el temps d'espera per al control de les colònies es va dur a terme l'assaig amb polvoritzador. L'espècie utilitzada en aquest cas només va ser *S. carpocapsae*, ja que segons els resultats de l'assaig de susceptibilitat és l'espècie que produeix més mortalitat. L'assaig es va dur a terme amb un esprai manual amb regulador de la mida de les gotes. L'aplicació es va fer apropant l'esprai fins a la mateixa superfície dels nius, i la dosi de nematodes utilitzada va ser de 200.000 nematodes en una suspensió aquosa de 25 ml d'aigua estèril per cada niu. Els controls van rebre 25 ml d'aigua estèril. En aquest cas, el control de mortalitat es va fer juntament amb el de la P2.

3.3.3. Resultats

Amb la dissecció dels nius de les parcel·les on s'havien introduït els cadàvers de *G. mellonella* no es va poder observar mortalitat en cap cas. Tenint en compte que només s'havia esperat 2 setmanes a fer el control en la P1, es va decidir esperar 4 setmanes a fer el control de la P2, com ja s'havia comentat anteriorment, ja que Triggiani i Tarasco (2002) van trobar els resultats més significatius al cap d'aquest temps. Per una altra banda, es va fer una repetició de la P1 per si hi hagués hagut algun problema amb els nematodes entomopatògens.

Els resultats obtinguts en la P2 i en la repetició de la P1 també van ser negatius. Es va poder observar mortalitat per fongs, però no es va observar mortalitat per nematodes en cap dels nius. La situació es va repetir en les colònies que s'havien infectat amb els nematodes amb suspensió aquosa.

En l'observació dels eppendorf i la dissecció de les larves de l'arna de la cera es va poder veure que hi havia diferents situacions. Es varen poder observar 52 eppendorf amb la seva corresponent larva, en els 8 que no es van poder observar la larva estava molt degradada o no es va poder trobar el eppendorf dins el niu.

Es va veure que en un 65,4% dels casos els nematodes havien mort dins de la larva de l'arna de la cera sense que semblés que haguessin sortit les formes infectives a l'exterior, i en el 34,6% restant es va poder observar que hi havia hagut sortida de nematodes a l'exterior del eppendorf o estava tenint lloc, i en el cas de no observar sortida, es trobaven nematodes vius dins de la larva de *G. mellonella*.

3.3.4. Discussió

El fet de que hi hagi hagut tants casos en que els nematodes no han arribat a sortir de les larves de *G. mellonella* podria haver estat el causant de que no s'apreciés mortalitat en les colònies de *T. pityocampa*.

En la majoria dels casos es va apreciar una dessecació de la larva de *G. mellonella* en observar-la a la lupa. En els casos en que aquesta dessecació era extrema, es va veure que els nematodes entomopatògens havien mort en la larva sense arribar a sortir les formes infectives. El fet de que els juvenils infectius no arribessin a sortir a l'exterior podria ser degut a que hi hagués condicions adverses per a que poguessin continuar el cicle biològic. Caldrà avaluar si les temperatures i el vent poden haver tingut algun efecte perjudicial en l'efectivitat i la mort dels nematodes que no havien arribat a sortir del cadàver de *G. mellonella*.

Per avaluar l'arrel del problema s'han revisat les temperatures a l'exterior i l'interior del niu. La diferència d'amplitud tèrmica en l'àrea d'estudi entre dins i fora dels nius era diferents segons l'hora del dia: a primera hora del matí hi havia una diferència mitjana de 7,7°C entre l'interior i l'exterior dels nius. Per una altra banda, les diferències s'escurçaven a mesura que avançava el dia. Cap a la tarda, la diferència de temperatures de mitjana entre exterior i interior era de 3,6°C. Les temperatura més baixa registrada en l'interior d'un niu de processionària va ser de 15,2°C, però cal tenir en compte que a les nits les temperatures podria ser que haguessin baixat per sota d'aquesta.

Si s'observen els rangs de temperatura òptims per a les diferents espècies de nematodes, es veu que en el cas de *S. carpocapsae* té el seu rang de temperatura òptima entre 22 i 28°C, de manera que les baixes temperatures redueixen la seva capacitat d'infecció. *Heterorhabditis bacteriophora* pateix una reducció en la seva eficàcia quan les temperatures estan per sota de 20°C, en canvi, algunes soques de *S. feltiae* són capaces de mantenir la seva capacitat infectiva a temperatures per sota dels 10°C (Garcia del Pino, 2005). Per una altra banda, *S. carpocapsae* té una altra tolerància a la dessecació, a la hipòxia, als rajos ultraviolats i al fred, la qual cosa el converteix en una espècie molt resistent per als treballs de camp, tot i que el fred redueixi la seva capacitat d'infecció. En el cas de *S. feltiae* té tolerància moderada a tots els factors anteriors, excepte al fred, que té alta tolerància. Si es miren les toleràncies per *H. bacteriophora* es pot veure que és poc tolerant a tot excepte al fred, que hi té tolerància moderada (Grewal, 2002). Per tant, l'espècie més resistent és *S. carpocapsae*, fet que coincideix amb que la majoria de larves on encara estaven vius els nematodes i en que aquests estaven sortint a l'exterior eren d'aquesta espècie.

Per avaluar una possible dessecació dels nius caldrà veure la humitat en el seu interior. En les mesures preses en camp es situava sempre entre un 85% i un 95%, la qual cosa indica que és un medi ideal per al correcte moviment de recerca d'hoste dels nematodes, per tant, no hi hauria d'haver problemes. Cal avaluar però si hi pot haver hagut moments puntuals de baixada intensa de les temperatures i de la humitat, que hagi creat unes condicions adverses tant grans que hagi tingut efecte sobre els cadàvers de l'arna de la cera, tenint en compte que aquesta actua com amortidor per condicions ambientals extremes ajudant als juvenils infectius allargar la seva persistència (Koppenhöfer *et al.*, 1995)

En l'època en que s'ha realitzat el treball de camp la climatologia ha estat inusual. S'han enregistrat temperatures i vent poc freqüents en la zona. Els dia 24 de gener, dia en que ja s'havia realitzat el l'assaig de camp i que tenia lloc el període d'espera per al recull de tots els nius de la P2 i de l'assaig de polvorització es van registrar dades de vents molt forts arreu de Catalunya. A l'estació meteorològica d'Ulldemolins, població propera a la Bisbal de Falset, es varen registrar ratxes màximes de 116,28 Km/h (Servei Meteorològic de Catalunya), dades molt poc usuals en la zona. Això podria haver fet disminuir tant la humitat de forma puntual que hagués provocat una dessecació en les larves de *Galleria*, de manera que morissin els nematodes en el seu interior. Per una altra banda, cal tenir en compte que normalment els hiverns són freds a la zona. Aquest hivern ha estat particularment dur: al gener, febrer i març del 2008 la mitjana de les temperatures mínimes enregistrades varen ser de -0,04°C, 1,9°C i 1,6°C respectivament, i aquest any van ser de -0,5°C, 0,3°C i 1,6°C (com. pers, Masip Gorgori, E.). Per tant, es pot observar que les baixes temperatures podrien haver baixat per sota dels 15°C en l'interior del niu, creant condicions desfavorables per a la infecció, de manera que podria haver tingut una incidència sobre la sortida dels nematodes de les larves.

Cal tenir en compte que la dessecació podria haver afectat de forma més acusada els nius on es va dur a terme l'assaig de polvorització, ja que els nematodes no tenien protecció com en el cas dels que estaven en l'interior de *G. mellonella*. Cal tenir en compte també que aproximadament un 50% de la suspensió de nematodes es perd per percolació (Triggiani i Tarasco, 2002), amb el qual disminuïa molt la quantitat de nematodes en el niu. Podria ser per aquests motius que en l'assaig de polvorització tampoc es varen poder apreciar resultats.

En cas de voler-se repetir les investigacions caldria canviar la posició del eppendorf en el niu i introduir-lo fins dins, d'aquesta manera quedaria més protegit del clima exterior. Caldria estudiar però si les erugues el consideren un objecte estrany i el treuen del niu. En la present investigació es va observar una bona integració del eppendorf en el niu per part de les erugues, ja que no el consideraven un objecte estrany, però val a dir que estava immobilitzat entre els filaments de seda i que podria ser el motiu de que no l'haguessin mogut. Caldria pensar també en aplicar alguna solució aquosa per facilitar el moviment dels nematodes en el niu i per allargar la seva persistència.

4. Conclusions

Un cop acabats els assajos pertinents s'ha arribat a les següents conclusions:

- La processionària del pi és molt susceptible als nematodes entomopatògens. Tant *S. carpocapsae* com *S. feltiae* i *H. bacteriophora* provoquen mortalitats elevades en les larves de processionària. Cal destacar que les larves són molt susceptibles a la soca de *S. carpocapsae* utilitzada, tenint en compte l'elevada mortalitat produïda en poc temps i baixes dosis d'infecció.
- La producció de nematodes entomopatògens és molt superior en *G. mellonella* que en *T. pityocampa*. Es manté el mateix comportament pels dos insectes, de manera que *S. carpocapsae* és l'espècie que té produccions més elevades, seguida de *H. bacteriophora* i *S. feltiae*. S'ha vist que en alguns casos aquests últims han tingut problemes de reproducció un cop han estat en l'interior de la larva, de manera que no s'han arribat a recollir juvenils infectius.. Per tant, es pot dir que les larves de processionària no són molt bons hostes per als nematodes entomopatògens, però ho són menys per *H. bacteriophora* i *S. feltiae*.
- L'aplicació en camp es farà mitjançant les càpsules eppendorf perforades amb la part inferior tallada, ja que s'ha vist que afavoreix la sortida de nematodes en alguns casos. Caldrà que les larves de *G. mellonella* siguin grans i estiguin en el seu últim estadi. La dosi a aplicar serà d'una lava de l'arna de la cera dins la càpsula eppendorf per cada colònia, ja que les produccions obtingudes per cada larva superen les marcades com a referència.
- L'aplicació de camp no ha resultat efectiva a causa de la mort dels nematodes entomopatògens en la majoria dels casos abans de sortir de la larva de *G. mellonella*. Aquest fet podria haver estat donat per condicions ambientals adverses. En el cas de voler repetir l'experiment caldria fer canvis en l'aplicació de les càpsules i avaluar la possibilitat d'afegir humitat al niu.

Per tant, els nematodes entomopatògens serien una bona opció per a controlar la plaga de *T. pityocampa*, però caldria canviar els paràmetres de l'aplicació en camp per assegurar el seu bon funcionament.

5. Pressupost

A continuació es presenten els costos que suposaria una repetició de la investigació. Cal tenir en compte que en ell s'han inclòs els costos de tot el material, incloent el dels nematodes entomopatògens i de les larves de *G. mellonella*, per estimar el cost real de la investigació si s'hagués de realitzar de forma independent. Remarcar també que no s'han estimat els costos del material no fungible de laboratori utilitzat, com poden ser el microscopi, lupa, càmeres de comptatge, etc., ja que es pressuposa que es disposa de tot aquest material.

	PREU (IVA inclòs	QUANTITAT	TOTAL (euros)
Material fungible:			
- plaques de Petri 9 cm diàmetre (capsa 500 u)	36,01	1	36,01
- plaques de petri 5 cm diàmetre (capsa 1200 u)	69,73	1	69,73
- paper de filtre (paquet 100 fulls 58x58 cm)	35,86	1	35,86
- càpsules Eppendorf (capsa 1000 u)	9,02	1	9,02
- puntes micropipeta automàtica 1000µl (paquet 100 u)	13,30	1	13,30
Polvoritzador manual capacitat 1L	2,00	1	2,00
Larves de <i>Galleria mellonella</i> (capsa 250 larves)	12,73	2	25,46
Nematodes entomopatògens:			
- <i>Steinernema feltiae</i> : Entonem [®] de Koppert, (preparat amb 50 milions de nematodes)	35,83	1	35,83
- <i>Steinernema carpocapsae</i> : Capsanem [®] de Koppert (preparat 50 milions)	39,41	1	39,41
- <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> : Larvanem [®] de Koppert (preparat 50 milions)	31,69	1	31,69
Recursos humans:			
- Laboratori (sou de becari)	6	448 hores	2688
- Camp (sou de becari)	6	128 hores	768
		TOTAL	3754,31

6. Bibliografia

Pàgines web:

Equip de l'Institut Cartogràfic de Catalunya (2009). Descàrrega de sèries del ICC.
<http://www.icc.es/web/content/ca/prof/cartografia/productes.html> (Juny 2009).

Generalitat de Catalunya, Dept. Medi Ambient (2009). Estadístiques d'incendis de la secció del medi de la web del Departament de Medi Ambient.
http://www.mediambient.gencat.net/cat/el_medi/incendis/bdd_estadistiques.jsp
 (Maig 2009)

Infoagro Systems, S.L. (Desconegut): La procesionaria de los pinos.
<http://www.infoagro.com/forestales/procesionaria2.htm> (Gener 2009)

Servei Meteorològic de Catalunya (2006). Dades d'Estacions Meteorològiques Automàtiques.
http://www.meteocat.com/mediamb_xemec/servmet/marcs/marc_dades.html
 (Juny 2009)

Publicacions:

Artola-Bordàs, F., Arnedo-Pena, A., Romeu-Garcia, M.A., Bellido-Blasco, J.B., 2008. Brote epidémico de dermatitis por la oruga procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) en escolares. An. Sist. Sanit. Navar. 31 (3): 289-293.

Bachiller *et al.*, 1981. Plagas de insectos en las masas forestales españolas, capítulo V: plagas de pinos y otras coníferas. Ministerio de Agricultura y Pesca. 51-64.

Departament de Medi Ambient, Secció de Gestió Forestal. Butlletí de plagues i malures dels nostres arbres: 01. Processionària del pi. 2^a edició.

Garcia del Pino, F., 1988. Susceptibilidad de las larvas de *Gortyna xanthenes* (Germar) (Lep. Noctuidae) al nematodo entomopatógeno *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Nematoda, Rhabditia). Bol. San. Veg. Plagas, 14:119-126.

Garcia del Pino, F., 2005. Los nematodos entomopatógenos agentes de control de plagas. En: Jacas, J. et al., El control biológico de plagas y enfermedades. Capítulo 2: Agentes de control biológico de plagas. Publicacions de la Universitat Jaume I, Col·lecció Medi Ambient 5.

Gill, S.A., Raupp, M.J., 1994. Using entomopathogenic nematodes, conventional and biorational pesticides for controlling bagworm. Journal of Arboriculture, 20: 318-322.

Gill, S.A., Raupp, M.J., 1997. Evaluation of biological and chemical applications for control of Iris borer. Journal of Environmental Horticulture, 15: 108-110.

- Grewal, P.S. 2002. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology, Chap. 13. CAB International. pp. 265-284.
- Jarauta F., De Lucas, J., Chao, R., Jardí, M.S., 2006. La larga història climàtica de nuestro planeta. En: Atlas Medioambiental de Le Monde Diplomatique, edición española, Capítulo 1. Ediciones Cybermonde, S.L.
- Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente. Boletín de plagas: *Rhyacionia duplana* Hb. Patrimonio natural: Uso y Gestión.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K., Taormino, S.P., 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditia: Steinernematidae) at different soils depths and moistures. J. Invertebr. Pathol., 65: 193-199.
- Nash, R.F., Fox, R.C. 1969. Field control of the Nantucket pine tip moth by the nematode DD-136. Journal of Economic Entomology, 62: 660-663.
- Núñez, L., Ramonell, A., 2002. La procesionària del pi. L'insecte defoliador dels pinars autòctons. En: Quaderns de natura, nº13. Govern de les Illes Balears, Dept. de Medi Ambient.
- Perez, E.E., Lewis, E.E., Shapiro-Ilan, D.I., 2003. Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditia: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. J. Invertebr. Pathol., 82: 111-118.
- Reardon, R.C., Kaya, H.K., Fusco, R.A., Lewis, F.B., 1986. Evaluation of *Steinernema feltiae* and *S. bibionis* (Rhabditia: Steinernematidae) for suppression of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Pennsylvania, USA. Agriculture, Ecosystems and Environment, 15: 1-9.
- Rejat, L., 1998. Tratamiento de bolsones de Procesionaria del Pino, *Thaumetopoea pityocampa* (Den. et Schiff.), mediante balines conteniendo deltametrin. Bol. San. Veg. Plagas, 24: 621-628.
- Sanchis, N., Cobos, P., Cobos, J.M., Soria, S., 1990. Lucha contra la procesionaria del pino *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. (Lepidoptera, Thaumetopoeidae): ensayos de lucha química con productos inhibidores del desarrollo, bacterianos y piretroides. Bol. San. Veg. Plagas, 16: 229-245.
- Shapiro, D.I., Glazer, I., 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. Environ. Entomol., 25: 1455-1461.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E., 1999. Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. Environ. Entomol., 28: 907-911.

- Shapiro, D.I., Lewis, E.E., Tedders, W.L., 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-hosts cadavers compared with application in aqueous suspension. *J. Invertebr. Pathol.*, 83: 270-272.
- Shetlar, D.J.(1999) Application methods in different cropping systems. In: Polarapu, S. (ed.). *Proceedings of the Workshop on Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management*. August 28-30, New Brunswick, New Jersey, pp. 31-36
- Triggiani, O., Tarasco, E., 2001. Preliminary attempts to control overwintering populations of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. et Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) with *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae). *Entomologica, Bari*, 35: 7-15.
- Triggiani, O., Tarasco, E., 2002. Efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes in controlling larval populations of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Biocontrol Science and Technology*, 12: 747-752
- Woodring, J.L., Kaya, H.K, 1998. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. *South. Co-operative Serv. Bull.* 331: 1–30.